



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قزوین

دانشکده پزشکی

پایان نامه

کارشناسی ارشد میکروبیشناسی پزشکی (M.Sc)

عنوان:

فراوانی ژنهای $ant(4'')$, $aph(3')$, $[aac(6')/aph(2'')]$ و تعیین مقاومت به آمینوگلیکوزید ها باروش های فنوتیپی و ژنوتیپی در
ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران بستری در بیمارستانهای آموزشی قزوین و تهران

استاد راهنما

سرکار خانم دکتر معصومه اصلانی مهر

استاد مشاور:

جناب آقای دکتر امیر پیمانی

جناب آقای دکتر امیر جوادی

نگارش:

ولی عباسی

سال تحصیلی ۹۳-۹۲



تقدیم:

به پدر و مادرم که بعد از خداوند بزرگ هر چه دارم از زحمات بی کران شان می باشد.

به همسر مهربانم که همواره در سختی های زندگی پشت و پناهم بوده.

به دخترم که وجودش شیرینی زندگی ام را صد چندان نموده.

قطره سپاسی در مقابل زحمات بی کران و خوبی هایشان.

از استاد راهنما سرکار خانم دکتر اصلانی مهر کمال تشکر و سپاسگذاری را دارم که همواره با صبر و حوصله در به ثمر رسیدن این پایان نامه یاریم نمود.

از جناب آقای دکتر امیر پیمانی که بدون هیچ چشم داشتی مرا در انجام این پایان نامه یاری نمودند کمال تشکر و سپاسگذاری را دارم.

از ریاست محترم گروه میکروب شناسی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، جناب آقای دکتر ناصرپور کمال تشکر را دارم که همیشه در همه موارد و مشکلات در کنار و کمک حال گروه بوده اند. با تشکر و قدردانی از اساتید محترم گروه، کارشناسان و کارکنان آزمایشگاه های میکروب شناسی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی.

با تشکر از همکاری آزمایشگاه های بیمارستان های کوثر، بوعلی، قدس، شهید رجایی و امام حسین (ع) به خصوص جناب آقای رضی پور

فهرست مطالب

۱۱+۱.....	چکیده فارسی
۳.....	فصل اول مقدمه و کلیات
۴.....	۱- معرفی و بیان مسئله
۸.....	۱-۱- تاریخچه
۸.....	۱-۲- طبقه بندی
۱۲.....	۱-۳- مورفولوژی و فیزیولوژی
۱۵.....	۱-۴- ساختار آنتی ژنی و شاخص های بیماری زایی
۱۸.....	۱-۴-۱- پپتیدوگلیکان
۱۸.....	۱-۴-۲- اسید تاپکوئیک
۱۸.....	۱-۴-۳- کپسول
۱۹.....	۱-۴-۴- پروتئین A
۲۱.....	۱-۴-۵- توکسین ها
۲۳.....	۱-۴-۶- آنزیم ها
۲۴.....	۲- تنظیم شاخص های بیماری زایی
۲۵.....	۳- علائم بالینی
۲۷.....	۴- بیماری های بالینی
۲۷.....	۴-۱- بیماری های مرتبط با توکسین
۲۷.....	۴-۱-۱- سندروم شوک سمی
۳۰.....	۴-۱-۲- بیان زن های توکسین زا
۳۱.....	۴-۱-۳- سندروم فلسی شدن پوست
۳۲.....	۴-۱-۴- مسمومیت غذایی

۳۲	۴-۲- عفونت های پوست و بافت نرم
۳۳	۴-۳- باکتری می
۳۴	۴-۴- اندوکاردیت
۳۴	۴-۵- عفونت های تنفسی
۳۵	۴-۶- آرتريت عفونی
۳۷	۵- تشخیص آزمایشگاهی
۴۰	۶- درمان
۴۲	۷- مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیکی
۴۴	۷-۱- تغییر در مسیرهای متابولیک
۴۴	۷-۲- تولید آنزیم های غیر فعال کننده عوامل ضد میکروبی
۴۵	۷-۲-۱- بتالاکتامازها
۴۶	۷-۲-۲- آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزید ها
۴۶	۷-۲-۳- کلرامفنیکل استیل ترانسفراز
۴۶	۷-۳- تغییر محل های اثر آنتی بیوتیک ها
۴۶	۷-۳-۱- پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین
۴۷	۷-۳-۲- ریبوزوم ها
۴۷	۷-۳-۳- DNA- ژیراز و توپوایزومراز ۴
۴۸	۷-۴- پمپ های افلاکس
۴۹	۸- مقاومت آنتی بیوتیکی
۵۰	۸-۱- مقاومت به پنی سیلین
۵۰	۸-۲- مقاومت به متی سیلین
۵۲	۸-۳- مقاومت به کینولون ها

۵۳	۸-۴- مشتقات هگزا هیدروکینولون
۵۴	۸-۵- مقاومت به آمینوگلیکوزید ها
۵۶	۹- اهمیت روش های مولکولی
۵۷	۹-۱- به کار گیری PCR
۵۹	بخش دوم : اهداف و فرضیات
۶۲	بخش سوم : بررسی متون
۶۷	بخش چهاروم : مواد و روش ها
۶۸	۱-جامعه مورد مطالعه
۷۰	۲-جمع آوری نمونه
۷۰	۳-آزمایش های تشخیصی فنوتیپی تعیین هویت
۷۷	۳-۱-تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی
۷۷	۳-۲-تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC).....
۷۸	۴-روش های تشخیص مولکولی
۷۸	۴-۱-استخراج DNA
۸۰	۴-۲-PCR.....
۸۱	۴-۳-تعیین هویت مولکولی
۸۲	۴-۴- PCR زن های مولد مقاومت
۸۲	۴-۵-الکتروفورز
۸۶	۵- روش جمع آوری و تجزیه و تحلیل داده ها
۸۷	بخش پنجم :یافته ها
۸۸	۱- یافته های زمینه ای
۹۱	۲-یافته های آزمون های فنوتیپی

۹۶.....	۳- یافته های آزمون های مولکولی
۱۰۳.....	بخش ششم بحث و نتیجه گیری
۱۱۴.....	منابع و مآخذ
۱۲۴.....	چکیده انگلیسی
۱۲۵.....	پیوست

فهرست جداول:

۱۰.....	جدول ۱- طبقه بندی علمی استافیلوکوکوس اورئوس
۱۶.....	جدول ۲- فاکتورهای بیماری زایی استافیلوکوکوس اورئوس
۲۰.....	جدول ۳- MSCRAMMs در استافیلوکوکوس اورئوس
۲۸.....	جدول ۴- تشخیص بالینی سندرم شوک سمی استافیلوکوکی
۳۹.....	جدول ۵- آزمایش های افتراق استافیلوکوکوس اورئوس
۵۴.....	جدول ۶- ساختمان دو مشتق هگزاهیدروکینولون (7b-3, 7b-4)
۶۹.....	جدول ۷- جدول متغیرها
۷۷.....	جدول ۸- دیسک های تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی
۸۵.....	جدول ۹- شرایط دمایی PCR ژن های (femA, aph(3')-IIIa, ant(4')-Ia, aac(6')-Ie-/aph-(2'')
۸۵.....	جدول ۱۰- توالی پرایمرهای ژن های (femA, aph(3')-IIIa, ant(4')-Ia, aac(6')-Ie-/aph-(2'')
۸۹.....	جدول ۱۱- توزیع ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس بر حسب نوع نمونه
۹۰.....	جدول ۱۲- توزیع ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس بر حسب بخش بیمارستانی
۹۱.....	جدول ۱۳- نتیجه تست مقاومت به دیسک های آنتی بیوتیکی
۹۳.....	جدول ۱۴- حداقل غلظت مهار (MIC) جنتامایسین به روش آگاردایلوشن

جدول ۱۵- فراوانی ژن های مقاومت به آمینو گلیکوزیدها در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس ۱۰۰

جدول ۱۶- فراوانی ژن های مقاومت به آمینو گلیکوزیدها در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس ۱۰۱

فهرست تصاویر:

تصویر ۱- بروز مقاومت آنتی بیوتیکی در استافیلوکوکوس اورئوس در طی دهه های ۲۰۰۰-۱۹۲۰ ۱۲

تصویر ۲-نمای میکروسکوپی دستجات خوشه انگوری استافیلوکوکوس اورئوس ۱۴

تصویر ۳- گردهم آبی پتیدوگلیکان در استافیلوکوکوس اورئوس ۱۷

تصویر ۴-نقشه ژنتیکی پروتئین A ۱۹

تصویر ۵- سندروم فلسی شدن پوست ۳۱

تصویر ۶- سندروم فلسی شدن پوست موضعی ۳۱

تصویر ۷- سلولیت آرنج دست ۳۳

تصویر ۸- لزیون های پوستی در impetigo ۳۳

تصویر ۹- مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها ۴۳

تصویر ۱۰- تست کاتالاز بر روی لام ۷۲

تصویر ۱۱- تست کوآگولاز لوله ای ۷۳

تصویر ۱۲- تست DNase ۷۴

تصویر ۱۳- تست مانیتول سالت آگار روی پلیت ۷۴

تصویر ۱۴- دستگاه ترموسایکلر Applied Biosystems ۸۲

تصویر ۱۵- آزمایش آنتی بیوگرام روی پلیت ۹۲

تصویر ۱۶- تعیین MIC به روش آگار دایلوژن ۹۳

تصویر ۱۷- ژل الکتروفورز ژن fem A ۹۶

تصویر ۱۸- ژل الکتروفورز ژن ant(4')Ia ۹۷

تصویر ۱۹- ژل الکتروفورز ژن aph(3')IIIa ۹۸

تصوير ٢٠- ژل الکتروفورز ژن [aac(6')-Ie/aph(2'')] ٩٩

چکیده:

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از شایع ترین عوامل عفونی باکتریایی می باشد، این باکتری یکی از عوامل عفونت های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است. آمینوگلیکوزیدها عوامل باکتری سیدال قدرتمندی هستند که اغلب به صورت ترکیبی همراه با بتالاکتام ها یا گلیکوپپتیدها به خصوص در درمان اندوکاردیت استافیلوکوکی مصرف می شوند. غیرفعال سازی آنزیمی دارو توسط آنزیم های سلولی تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها، اصلی ترین مکانیسم مقاومت به این دارو در استافیلوکوک ها است.

هدف اصلی تحقیق حاضر تعیین فراوانی ژن های $ant(4')-la.[aac(6')-le-aph(2'')]$ و $aph(3')-IIIa$ کد کننده آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها به روش مولکولی PCR در ایزوله های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس است.

مواد و روش ها: پس از جمع آوری ۲۳۰ ایزوله بالینی استافیلوکوکوس اورئوس از بیمارستان های آموزشی شهر قزوین و تهران در طی مدت ۱۴ ماه، ابتدا تمامی ایزوله ها با استفاده از روش های استاندارد بیوشیمیایی و آزمایشگاهی تعیین هویت شدند. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی سویه ها به روش دیسک دیفیوژن توسط دیسک های آنتی بیوتیکی جنتامایسین، کانامایسین، توبرامایسین، آمیکاسین، نیتیل مایسین، سیپروفلوکساسین، داکسی سایکلین، موپی روسین، ریفامپیسین و تیکو پلانین با رعایت اصول CLSI تعیین شد. همچنین توسط روش رقیق سازی در آگار، حداقل غلظت مهار کنندگی با استفاده از پودر آنتی بیوتیکی جنتامایسین تعیین شد. برای تشخیص ژن های مقاومت از سه جفت آغازگر اختصاصی استفاده شد. و با استفاده از روش PCR فراوانی آن ها تعیین گردید.

نتایج: بیشترین میزان مقاومت در مقابل آمینوگلیکوزیدها به ترتیب در کانامایسین (۴۸/۳ درصد)، جنتامایسین (۴۷ درصد)، توبرامایسین (۴۷ درصد)، آمیکاسین (۴۶/۱) و نیتیل مایسین (۲۶/۱) درصد و بیشترین میزان مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های غیر آمینوگلیکوزید استفاده شده در این مطالعه به ترتیب، داکسی سایکلین (۵۰/۵) درصد، سیپروفلوکساسین (۵۰) درصد، ریفامپیسین (۳۶/۵) درصد، موپی روسین (۹/۱) درصد و تیکوپلانین (۴/۳) درصد مشاهده شد. در روش رقیق سازی در آگار ۴۴/۶ درصد سویه ها نسبت به جنتامایسین مقاوم بودند. در روش PCR فراوانی ژن های $[aac(6')-le-aph(2'')]$ ، $ant(4')-la$ و $aph(3')-IIIa$ به ترتیب ۳۹/۱، ۶/۵ و ۱۸/۳ درصد در ۲۳۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس گزارش شد. فراوانی ژن های $[ant(4')-la.[aac(6')-le-aph(2'')]$ و $aph(3')-IIIa$ در سویه های مقاوم به ترتیب ۶۲، ۱۰/۳ و ۲۹ درصد گزارش گردید. بیشترین شیوع را ژن $[aac(6')-le-aph(2'')]$ با ۶۲ درصد نشان داد. شیوع هم زمان هر دو ژن $ant(4')-la$ و $aph(3')-IIIa$ ، دو ژن $[ant(4')-la.[aac(6')-le-aph(2'')]$ و دو ژن $[aac(6')-le-aph(2'')]$ و $aph(3')-IIIa$ ، ۱۹/۳۱ درصد و شیوع هم زمان هر ۳ ژن ۷/۵۸ درصد گزارش گردید. از بین ۲۳۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس ۱۰۰ ایزوله (۴۳/۴۷٪) $MIC \geq 16$ و ۱۳۰ ایزوله (۵۶/۵۲٪) $MIC \leq 4$ را نشان دادند. در این مطالعه MIC_{50} 1 ug/ml و MIC_{90} غلظت بالای 256ug/ml می باشد. از کل ۲۳۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس ۴۹ درصد حداقل به یکی از آنتی بیوتیک های آمینو گلیکوزیدی مقاومت نشان دادند.

نتیجه گیری:

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه در مجموع از ۲۳۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی ۹۲ ایزوله (۴۰ درصد) قابلیت تولید حداقل یکی از ژن های *aph(3')-IIIa*، *ant(4')-Ia* و *[aac(6')-Ie/aph(2'')]* کد کننده AME را داشتند که از آن میان ۹۰ ایزوله ۳۹/۱ درصد دارای ژن *[aac(6')-Ie/aph(2'')]*، ۴۲ ایزوله ۱۸/۳ درصد دارای ژن *aph(3')-IIIa* و ۱۵ ایزوله ۶/۵ درصد دارای ژن *ant(4')-Ia* بودند.

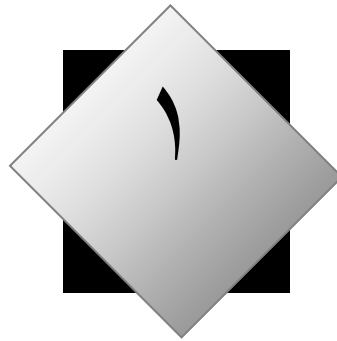
نتایج مطالعات انجام شده در سایر کشورها نشان داده که ژن *[aac(6')-Ie/aph(2'')]* فراوان ترین ژن کد کننده آنزیم های AME در ایزوله های بالینی در کشورهای اروپایی است.

همچنین طی مطالعه ای که در سال ۲۰۰۳ توسط چوی و همکاران در کره انجام شد نتایج مشابهی به دست آمد به این صورت که ژن *[aac(6')-Ie/aph(2'')]* با فراوانی ۶۵ درصد شایع ترین ژن در میان ایزوله های مورد مطالعه بوده و بعد از آن ژن های *ant(4')-Ia* و *aph(3')-IIIa* به ترتیب با فراوانی ۴۱ درصد و ۹ درصد شناسایی شدند.

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و مقایسه آن با سایر مطالعات مشابه مشاهده می شود که فراوانی و شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی با توجه به مناطق جغرافیایی متفاوت می باشد لذا شاید این دلیلی برای تفاوت بین نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات دیگر باشد.

با توجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی به موازات مصرف بالینی بیش از اندازه و بی رویه این داروها تشخیص سریع و به موقع سویه های مقاوم به منظور انتخاب گزینه های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به نظر می رسد. شناسایی سریع ژن های کد کننده آنزیم های AME با استفاده از روش PCR از مزیت های ویژه ای مثل دقت و سرعت بالابر خوردار است.

واژگان کلیدی: *Staphylococcus aureus*، *[aac(6')-Ie-aph(2'')]*، *ant(4')-Ia*، *aph(3')-III* و PCR



بخش اول

مقدمه و کلیات

۱- معرفی و بیان مسئله

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است که امروزه ، نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین‌ها، فلوروکوئینولون‌ها و ماکرولیدها مقاومت نشان می‌دهد. از اینرو امروزه تعداد محدودی از آنتی‌بیوتیک‌ها، همچون ونکومايسين و تیکوپلانیل به عنوان داروهای ضد استافیلوکوکی برای درمان این نوع عفونت‌ها در دسترس می‌باشند (۱،۲).

بروز عفونت‌های استافیلوکوکی در سال‌های اخیر به دلیل انتشار سویه‌های مقاوم ، افزایش بیماران باضعف ایمنی و استفاده بیش از حد از وسایل پزشکی مانند کاتتر و مداخلات تهاجمی پزشکی روبه افزایش است (۳).

علت شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به سبب کسبفاکتورهای مقاومتی متعدد می‌باشد. طی چند دهه‌ی اخیر افزایش قابل توجهی در ظهور سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (¹MRSA) و سایر آنتی‌بیوتیک‌های مقاوم به پنی‌سیلین‌ها به ویژه در عفونت‌های بیمارستانی مشاهده شده است (۴). از آنجایی که سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین به سایر آنتی‌بیوتیک‌های بتا لاکتام و سفالوسپورین‌ها نیز مقاوم می‌باشند لذا در درمان بیماران مبتلا به عفونت با این سویه‌ها از رژیم‌های درمانی حاوی ونکومايسين و آمینوگلیکوزیدها و سایر آنتی‌بیوتیک‌های غیر بتا لاکتام استفاده می‌شود (۵،۶).

آمینوگلیکوزیدها علیرغم داشتن سمیت کلیوی و سمیت شنوایی و مشکلاتی که در ارتباط با افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها نسبت به این داروها وجود دارد، همچنان در درمان عفونت‌های جدی استافیلوکوکی

باارزش هستند و نقش مهمی را در درمان و پیشگیری عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک‌ها بازی می‌کنند. آمینوگلیکوزیدها از ویژگی‌های متعددی برخوردارند و به همین دلیل از آن‌ها به عنوان عوامل ضد میکروبی مفید و با ارزش یاد می‌کنند. از میان این ویژگی‌ها می‌توان به فعالیت باکتریسیدالی وابسته به و اثرات سینرژیسمی آن‌ها با دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها (PAE^1) غلظت، اثر پس از مصرف آنتی‌بیوتیک موسوم به همچون بتالاکتام‌ها و گلیکوپپتیدها اشاره کرد (۷).

آمینوگلیکوزیدها اغلب به صورت ترکیب با بتالاکتام‌ها و گلیکوپپتیدها در درمان اندوکاردیت باکتریایی که توسط استافیلوکوک‌ها ایجاد می‌شود کاربرد دارند (۸و۹). این آنتی‌بیوتیک‌ها با اتصال به زیرواحد ریبوزومی 30S باعث تداخل در سنتز پروتئین‌های سلول باکتری می‌شوند (۱۰). مقاومت به آمینوگلیکوزیدها هم در باکتریهای گرم منفی هم در باکتریهای گرم مثبت گزارش شده است.

مکانیسمهای مقاومت:

مکانیسم‌های متفاوتی در ایجاد مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها شناسایی شده است که مهمترین آنها عبارتند از:

۱- تغییر هدف در جایگاه ریبوزومی اتصال دارو، ۲- پمپ افلاکس، ۳- کاهش در نفوذپذیری و دریافت دارو، ۴- تغییر 16SrRNA به واسطه متیلازها و ۵- آنزیمهای تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها (AMEs).

در مواردی ممکن است بیش از یک مکانیسم در یک زمان در باکتری در ایجاد مقاومت نقش داشته باشد. با این وجود، تولید آنزیمهای تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها (AMEs) از جمله شایعترین مکانیسم مقاومت در آمینوگلیکوزیدها محسوب میشوند که با تولید آنزیم‌های مخرب این داروها از جمله آمینوگلیکوزید استیل ترانسفراز (AACS)، آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفراز و (ANTs) آمینوگلیکوزید فسفو ترانسفراز (APH) صورت می‌گیرد. در سالهای اخیر گزارشاتی مبنی بر نقش قابل توجه عامل دیگر مقاومت به

آمینوگلیکوزیدها یعنی تغییر 16SrRNA به واسطه متیلازها وجود دارد که هفت ژن متیلاز در این خصوص شناسایی شده است که ژنهای آن عبارتند از: armA, rmtA, rmtB, rmtC, rmtD, rmtE, rmtF و npmA

۱- تغییر هدف در جایگاه ریبوزومی اتصال دارو، این نوع مقاومت در اثر تغییراتی که در نتیجه موتاسیونها در پروتیین های ریبوزومی و یا 16srRNA اتفاق می افتد به وجود می آید. این نوع موتاسیون ها بیشتر سبب بروز مقاومت به استرپتومایسین می گردد و موتاسیون های 16SrRNA بیشتر با بروز مقاومت نسبت به اسپکتینومایسین همراه است .

۲- سیستم های افلاکس آنتی بیوتیک : اخیراً "تعداد زیادی از سیستم های فعال افلاکس چند دارویی در باکتریهای گرم منفی شناخته شده که سبب بروز مقاومت ذاتی به آمینوگلیکوزید ها در این باکتری ها می شود .

پمپ های افلاکس، آنتی بیوتیک هایی که وارد باکتری شده اند را خارج کرده و سبب بروز مقاومت در سطح پایین (Low Level) نسبت به طیفی از آنتی بیوتیک های متعلق به کلاس های مختلف می گردد . این نوع مقاومت در باکتری هایی مانند پseudomonas آئروژینوزا ، آسینتوباکتر بورخولدرياپسودومالئی و اشرشیا کولی می گردد.

۳- کاهش در نفوذپذیری و دریافت دارو : باکتری های بیهوازی نسبت به آمینوگلیکوزید ها دارای مقاومت ذاتی می باشند زیرا دریافت دارو به داخل سلول باکتری نیازمند اختلاف پتانسیل الکتریکی که در دو سوی غشاء سیتوپلاسمی در نتیجه تنفس هوازی به وجود می آید ، می باشد .

در استافیلوکوکوس اورئوس موتاسیون های کروموزومی که سبب کاهش در مقدار و یا نبود پتانسیل الکتریکی می گردند می توانند سبب به وجود آمدن مقاومت به آمینوگلیکوزیدها گردند این نوع

موتاسیون ها نسبت رشد را پایین آورده و به باکتری این امکان را می دهد تا در طی درمان با آمینوگلیکوزید ها زنده بماند (۱۰).

۴- در سالهای اخیر گزارشاتی مبنی بر نقش قابل توجه عامل دیگر مقاومت به آمینوگلیکوزیدها یعنی تغییر 16SrRNA به واسطه متیلازها وجود دارد که هفت ژن متیلاز در این خصوص شناسایی شده است

که ژنهای آن عبارتند از: *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF* و *npmA*

۵- مکانیسم پنجم غیرفعال سازی آنزیمی دارو می باشد، که به عنوان اصلی ترین مکانیزم مقاومت هم در

باکتری های گرم مثبت و هم در باکتری های گرم منفی شناخته شده است . این نوع مقاومت که

توسط آنزیمهای تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها (AMES¹) به وجود می آید اصلی ترین

مکانیسم مقاومت به آمینوگلیکوزید ها در گونه های استافیلوکوکی نیز می باشد . این آنزیمها به سه

رده مختلف بر اساس فعالیت تغییر دهنده گی شان طبقه بندی می شوند که شامل :

۱- آمینوگلیکوزید استیل ترانسفرازها (AACs)

۲- آمینوگلیکوزید فسفریل ترانسفرازها (APHs)

۳- آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفرازها (ANTs) هستند (۱۱،۱۲،۱۳،۱۴).

این سه آنزیم توسط ژنهای *ant(4')-Ia* , *aph(3')-IIIa*, *aac(6')-Ie-/aph-(2'')* کد

میشوند (۸،۱۵،۱۶). ژنهای کد کننده آنزیمهای تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها روی پلا سمید یا روی

کروموزوم باکتری قرار گرفته اند (۹). با توجه به شیوع بالای مقاومت آنتی بیوتیکی و پتانسیل این ارگانیسم

در ایجاد بیماری های شدید تحقیقات وسیع و جامع بر روی استافیلوکوکوس اورئوس کاملاً "احساس می

شود. بنابراین در تحقیق حاضر سعی شده است فراوانی ژن های مولد آنزیم های تغییر دهنده آنتی بیوتیک

های آمینوگلیکوزیدی بر روی ایزوله های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس در این منطقه تعیین شود.

¹ Aminoglycoside-modifying enzymes

در این راستا ایزوله های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس از سطح بیمارستان های آموزشی قزوین و تهران جمع آوری شد و فراوانی ژن های (ant(4')-Ia , aph(3')-IIIa, aac(6')-Ie-/aph-(2") با روش مولکولی PCR بررسی شد .

۱-۱- تاریخچه استافیلوکوکسی:

برای نخستین بار در سال ۱۸۷۸ رابرت کخ متوجه حضور باکتریهای کروی شکل در آبسه چرک و خون بیماران شد و آن ها را میکرو کوکسی نامید. در سال ۱۸۸۰ لویی پاستور نشان داد که این ارگانیسم ها علاوه بر انسان برای موش و خوکچه هندی بیماری زا میباشند. در سال ۱۸۸۱ الکساندر اگستن^۱ نام استافیلوکوکوس را برای میکروکوکوس عامل عفونت، التهاب و ترشحات چرکی به کار برد و آن را مهمترین عامل ایجاد زخم معرفی نمود (۱۷،۱۸). خانواده میکروکوکاسه شامل دو جنس میکروکوکوس و استافیلوکوکوس می باشد. جنس استافیلوکوکوس اولین بار توسط روزنباخ^۲ در سال ۱۸۹۴ میلادی توصیف گردید. این جنس در آینده به دو گونه استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس آلبوس^۳ طبقه بندی گردید.

۱-۲- طبقه بندی:

در حال حاضر ۳۵ گونه در این جنس معرفی شده است (۱۷). مهمترین گونه بیماریزایی این جنس استافیلوکوکوس اورئوس میباشد و گونه های دیگر مانند استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس^۴ ، ساپروفیتوکوس^۵، لودونسیس^۶ و همولیتیکوس^۷ در ایجاد عفونتهای فرصت طلب نقش دارند.

¹Alexander ogston

² Rosenbakh

³S.albus

⁴S.epidermidis

⁵S.saprophyticus

⁶Iagdanensis

⁷S.haemolyticus

استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس در ایجاد عفونت مجرای ادراری در زنان جوانی که از نظر جنسی فعال هستند نقش عمده‌ای دارد (۱۷، ۱۹).

ویژگی‌های شیمیایی دیواره سلولی به ویژه ترکیب اسیدهای آمینه، توالی پل‌های درون پپتیدی پپتیدوگلیکان و ترکیب اسید تائیکوئیک، شاخصه‌های بیوشیمیایی مفید برای دسته‌بندی گونه‌های استافیلوکوکوس می‌باشد.

جدول ۱- طبقه بندی علمی / استافیلوکوکوس اورئوس (۱۳)

Scientific classification	
Domain	Bacteria
Kingdom	Eubacteria
Phylum	Firmicutes
Class	Bacilli
Order	Bacilalles
Family	Staphylococcaceae
Genus	<i>Staphylococcus</i>
Species	<i>aureus</i>

بسیاری از گونه ها به ویژه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس دارای L-لاکتات دهیدروژناز هستند، که تحت آنزیم آلدولاز فعال می شود همچنین بسیاری از گونه های استافیلوکوکوس را می توان بر اساس درصد نسبی ترکیبات اسید چرب سلولی و به روش کروماتوگرافی گاز - مایع از یکدیگر تمایز داد (۱۷).
خصوصیات استافیلوکوکوس اورئوس:

شواهد اولیه بیماریزایی استافیلوکوکوس اورئوس در سال ۱۹۴۱ توسط اسکینر^۱ و کفر^۲ نشان داده شده است (۲۰).

استافیلوکوکوس اورئوس از جمله مهمترین عوامل ایجاد کننده عفونتهای بیمارستانی و اکتسابی از جامعه می باشد و به دلیل قدرت بیماریزایی با لقوه و مقاومت روز افزون در برابر عوامل ضد باکتریایی به یکی از مشکلات بهداشتی مهم در جهان تبدیل شده است. این باکتری توانایی ایجاد طیف وسیعی از بیماری ها را دارد و از طریق تولید انواع توکسین ها، تهاجم مستقیم و تخریب بافتها، تظاهرات بالینی متنوعی را پدید می آورد (۱۷، ۲۱).

کشف پنی سیلین توسط الکساندر فلمینگ^۳ منجر به کنترل بیماری های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس شد ولی بروز مقاومت به پنی سیلین در این باکتری (PRSA^۴) از اوسط دهه ۱۹۴۰ آغاز گردید. معرفی متی سیلین در سال ۱۹۵۹ منجر به کاهش پاندمی های ناشی از استافیلوکوکوس فاژتایپ ۸۰/۸۱ گردید (۲۲). این در حالی است که مقاومت به متی سیلین در بین ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس اولین بار در سال ۱۹۶۱ گزارش گردید. و از اوسط دهه ۷۰ میلادی طغیان های بزرگی از عفونتهای ناشی از MRSA از بسیاری بیمارستانها گزارش شده است.

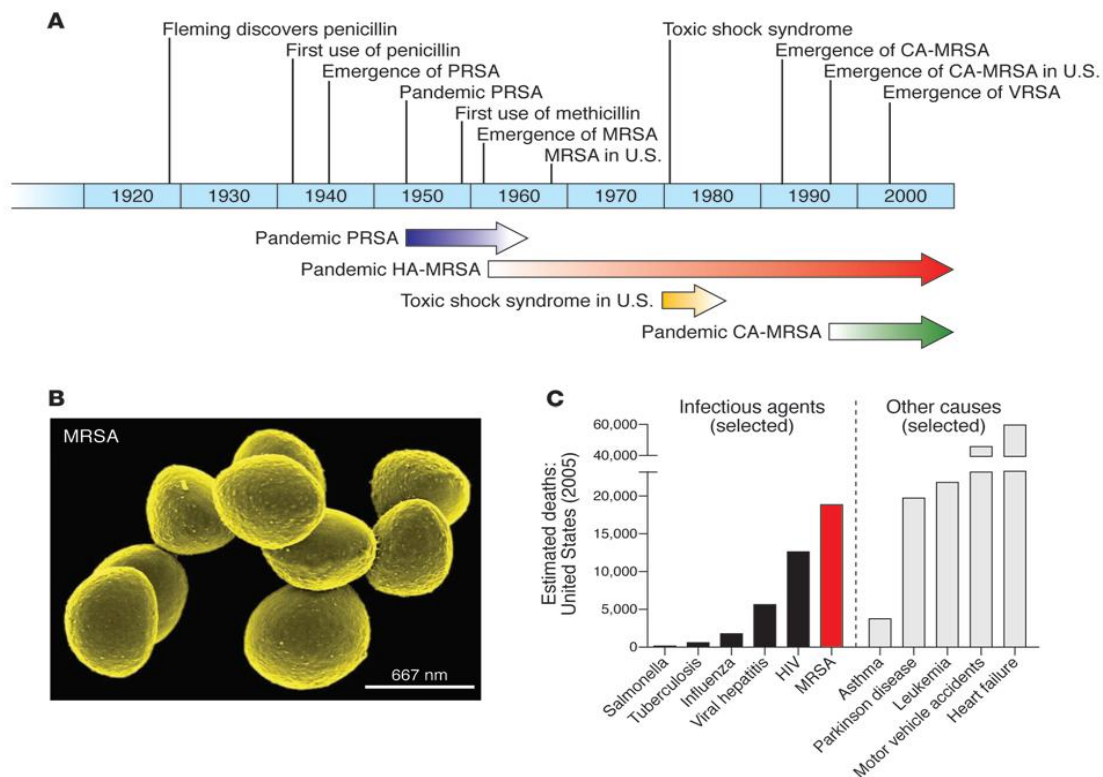
¹Skinner

²Keefer

³Alexander Fleming

⁴Pencilin resistant S. aureus

امروزه ایزوله های مقاوم به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان خطرناکترین سویه های بیماریزایی تلقی می گردند (۲۳،۲۴).



تصویر ۱- بروز مقاومت آنتی بیوتیکی در استافیلوکوکوس اورئوس در طی دهه های ۲۰۰۰-۱۹۲۰ (۲۵).

۳-۱- مورفولوژی و فیزیولوژی:

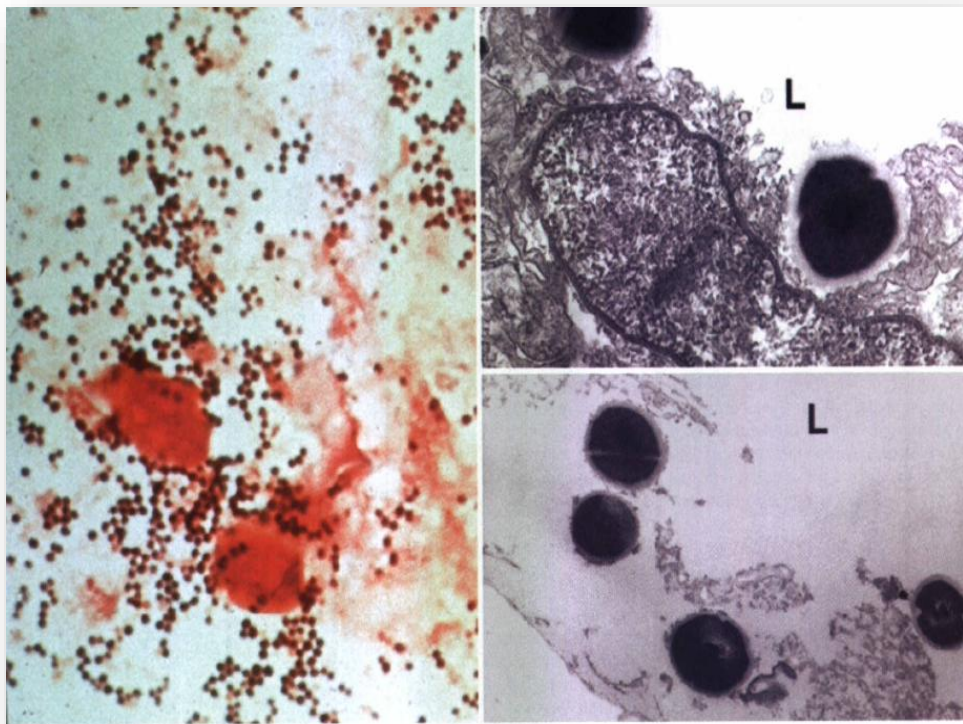
استافیلوکوکوس ها، کوکسی های (۱/۵ - ۰/۵ μm) گرم مثبت می باشند که به صورت منفرد، جفت، چهارتایی، زنجیره های کوتاه و توده های نا منظم شبیه خوشه انگور دیده میشوند (تصویر ۱-۲). نام استافیلوکوکوس از کلمه یونانی استافیل^۱ گرفته شده است که به معنی خوشه انگور می باشد. اکثر گونه ها فعالیت کاتالازی داشته و هوازی و بی هوازی اختیاری هستند. علاوه بر این غیر متحرک و غیر اسپورزا بوده و اغلب گونه ها در حضور ۱۰ درصد کلرور سدیم و دمای ۴۰-۱۸ درجه سانتی گراد قادر به رشد می باشند (۲۶).

¹Staphyl

استافیلوکوکوسها به راحتی در اغلب محیطهای کشت، در شرایط هوازی یا بی هوازی رشد می کنند. این باکتری ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد سریعتر رشد می کنند ولی تولید رنگدانه توسط آنها در دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتی گراد) بهتر انجام می شود. کلنی های این باکتری ها در محیط کشت جامد مدور، برجسته، صاف و براق هستند .

استافیلوکوکوس اورئوس معمولا کلنی های بزرگ سفید تا زرد طلایی ایجاد میکند، در حالی که کلنی های استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس معمولا لیمویی رنگ هستند.

بسیاری از کلنی ها فقط در نگهداری طولانی مدت رنگدانه تولید می کنند و هیچ رنگدانه ای در شرایط بی هوازی یا در محیط آبگوشت تولید نمی شود. این باکتری در کشتهای کهنه به صورت گرم منفی دیده میشود و نیز دارای اشکال بدون دیواره به نام L- فرم می باشد که اندازه متفاوتی داشته و گاهی آنقدر کوچک هستند که از صافی های ۵۰-۴۰nm عبور می کنند . استافیلوکوکوس هایی که همولیزین محلول تولید می کنند (در سطح محیط کشت خون دار)، منطقه ای از همولیزیتا را در اطراف کلنی های خود به وجود می آورند اگر چه همولیزیتا ترجیحا" مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس می باشد اما ممکن است توسط استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس نیز تولید شود(۲۷،۲۸).



تصویر ۲- نمای میکروسکوپی دستجات خوشه انگوری استافیلوکوکوس اورئوس (۵).

۴-۱- ساختار آنتی ژنی و شاخصهای بیماری زایی:

طیف وسیع بیماریزایی استافیلوکوکوس اورئوس به تولید پروتئین ها و فاکتورهای ویروالانس متنوعسویه های گوناگون آن بر می گردد.

برخی از این پروتئین ها به دیواره سلولی چسبیده اند و خود را در سطح سلول عرضه می دارند و به این ترتیب قادرند به پروتئین های موجود در خون نظیر ایمونوگلوبولین G و فیبرینوژن یا پروتئین- های دیگری نظیر فیبرونکتین و کلاژن متصل شوند.

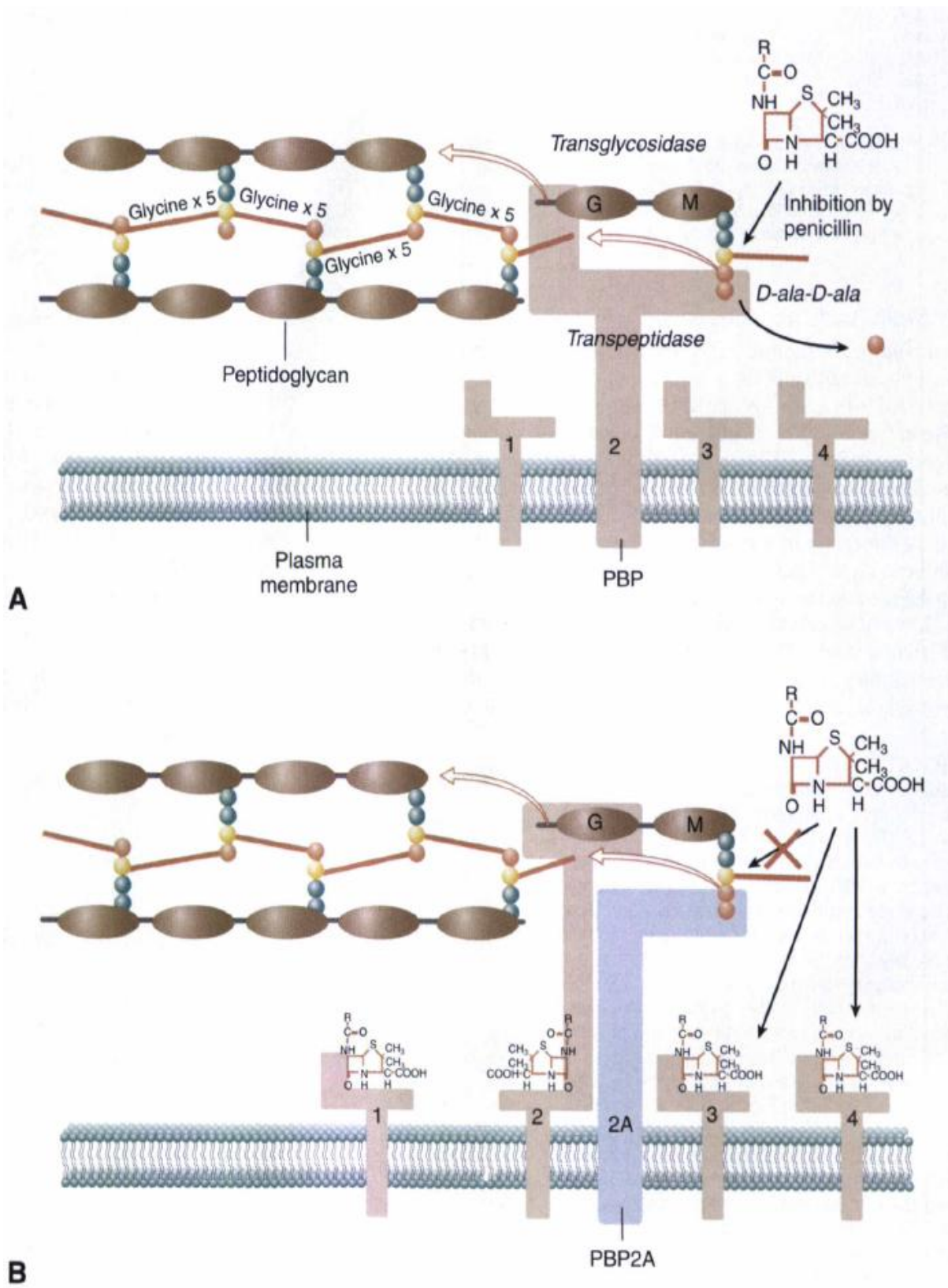
اصطلاح ملکول های ماتریکس چسبنده (¹MSCRAMMS) به این دسته از پروتئین ها اطلاق می گردد و نظیر آنها در سایر باکتری ها نیز معرفی شده اند. دو ویژگی مهمی که این پروتئینها در باکتری ایجاد می کنند شامل فرار از سیستم ایمنی میزبان با توجه به پوششی که از پروتئینهای میزبان به خود می گیرند . و دیگری چسبیدن به بافت های میزبان و شروع تهاجم به سلول های میزبان می باشد (۲۹). کواگولاز، پروتئین A، پروتئین های متصل شونده به کلاژن، فیبرینوژن، الاستین، فیبرونکتین و پروتئین های متصل شونده و ایمونوگلوبولین (²Sbi) از ترکیبات سطحی میکروبی هستند که به رسپتورهای میزبان می چسبند. اگر چه نقش کواگولاز در پاتوژنز مهم تلقی شده ولی تشکیل فیبرین در کانون های عفونت، یکی از روش های محافظت باکتری در برابر مکانیسم های دفاع میزبان به شمار می آید. علاوه بر این سایر اجزای ساختمانی نظیر کپسول پلی ساکاریدی، پپتیدوگلیکان واسید تایکوئیک وظرفیت بالای باکتری در تولید سموم و آنزیم های گوناگون با نقش های متنوع نیز در پاتوژنز باکتری نقش دارند (۱۹،۳۰).

¹ Microbial Surface Component Recognizing Adhesiv Matrix Molecules

² S.aureus binding of IgG

جدول ۲- فاکتورهای بیماری زایی استافیلوکوکوس اورئوس (۱۹).

فاکتورهای بیماری‌زایی	اثرات بیولوژیکی
کپسول	ممانعت از کموتاکسی و فاگوسیتوز، تسهیل اتصال باکتری به اجسام خارجی، مهار پرولیفراسیون سلولهای منونوکلئر پس از قرار گرفتن در معرض میتوزن.
اسید تایکوئیک	اتصال به فیبرونکتین، تنظیم غلظت کاتیونی در غشاء سلول
پروتئین A	ممانعت از پاکسازی وابسته به آنتی بادی از طریق اتصال به گیرنده های C ایمونوگلوبولین IgG ₄ , IgG ₂ , IgG ₁ فعالیت ضد کمپلمان.
سیتوتوکسین های C, B و لکوسیدین P-V	آسیب به بسیاری از سلولها از جمله لوکوسیت ها و ماکروفاژها، فیبروبلاست ها، اریتروسیت B و پلاکتها.
توکسین سندروم شوک سمی یک	به عنوان سوپر آنتی ژن باعث پرولیفراسیون لنفوسیت های T و رها سازی سایتوکان ها می شود، اثرات سیتوتوکسیک بر روی سلول ها.
انترتوکسین ها (G-I, A-E)	به عنوان سوپر آنتی ژن باعث پرولیفراسیون لنفوسیت های T و رها سازی سایتوکان ها می شود، اثرات سیتوتوکسیک بر روی سلول ها. ایجاد مسمومیت غذایی.
توکسین اکسفولیاتیو.	به عنوان سرین پروتئاز فعالیت اپیدرمولیتیک دارد.
کوآگولاز	تبدیل فیبرینوژن به فیبرینو ممانعت از پاکسازی باکتری توسط پاسخ ایمنی.
هیالورونیداز	افزایش انتشار استافیلوکوکوس به دلیل تجزیه اسید هیالورونیک بافت همبند
فیبرینولیزین	تجزیه فیبرین و انتشار باکتری.
کاتالاز	تجزیه پراکسید هیدروژن.
لیپاز	هیدرولیز لیپیدها.
نوکلئاز	هیدرولیز DNA



تصویر ۳-گرد هم آبی پپتیدوگلیکان در استافیلو کوکوس اورنوس

۱-۴-۱- پتیدوگلیکان:

پلیمر پلی ساکاریدی با زیر واحد اتصالی است که ساختار دیواره سلولی را استحکام می بخشد. پتیدوگلیکان تحت تاثیر اسیدهای قوی یا لیزوزیم تخریب می شود این ترکیب از واحدهای متناوب N- استیل مورامیک اسید و N- استیل گلوکز آمین تشکیل شده که توسط پل های پتوگلیسین و زنجیره های تترا پتیدی استحکام می یابد. پتیدوگلیکان فعالیت مشابه اندو توکسین داشته و سبب فعال سازی کمپلمان، تحریک تولید اینترلوکین یک (تب زاهای اندوژن) از مونوسیت ها و اجتماع لوکوسیت های پلی مورفو نوکلر میشود (۱۹،۳۱).

۱-۴-۲- اسید تایکوئیک:

اسیدهای تایکوئیک مخصوص گونه بوده و به طور کوالان به پتیدوگلیکان و یا با اتصال لیپوفیلیک به غشاء سیتوپلاسمی (اسیدهای تایکوئیک) متصل میشوند. در استافیلوکوکوس اورئوس ریبیتول تایکوئیک اسید با واحدهای N- استیل گلوکز آمین (پلی ساکارید A) و در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس گلیسرول تایکوئیک اسید با واحدهای گیلوزیل (پلی ساکارید B) وجود دارد. اسید تایکوئیک در اتصال باکتری به فیبرونکتین میزبان دخالت دارد و هر چند ایمونوژن ضعیفی میباشد ولی در اثر اتصال به پتیدوگلیکان باعث ایجاد پاسخ های آنتی بادی اختصاصی می گردد.

با استفاده از روش های انتشار در^۱ ژل می توان آنتی بادی های ضد اسید تایکوئیک را در بیماران مبتلا به اندوکاردیت فعال ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس را تشخیص داد (۳۲).

۱-۴-۳- کپسول:

کپسول از جنس پلی ساکارید بوده و بیشتر در داخل بدن موجود زنده تشکیل می شود. فقط گاهی بر روی سطح استافیلوکوکوس های کشت داده شده در آزمایشگاه یافت می شود.

¹Gel diffusion

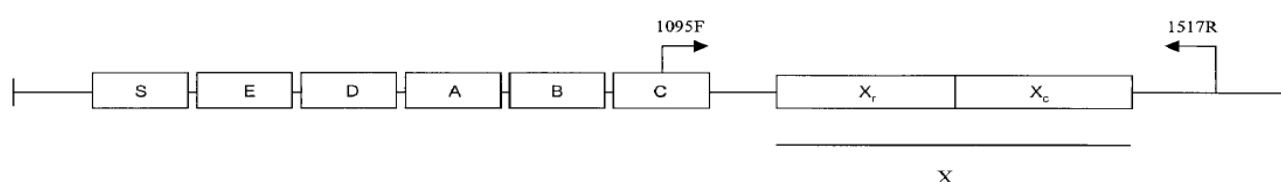
۱۱ سروتیپ کپسولی از این باکتری شناسایی شده است. کپسول از کموتاکی ممانعت کرده و از فاگوسیتوز ارگانسیم ها توسط لکوسیت های پلی مورفونوکلئر جلوگیری می کند .

همچنین با مهار تکثیر سلول های مونو نوکلئر پس از قرار گیری در معرض میتوزن، از باکتری محافظت می نماید. علاوه بر این کپسول میتواند سبب تسهیل اتصال باکتری به کاترها و سایر مواد مصنوعی شود (۲۱،۳۳).

۴-۱-۴-۱ پروتئین A:

سطح اکثر سویه های استافیلوکوکوس اورئوس توسط پروتئین A پوشیده شده است. این پروتئین به صورت کوالان به پپتیدوگلیکان باکتری متصل می شود. پروتئین A، یک پروتئین سطحی باکتریایی است که در میان گروهی از ادهزین ها، به نام اجزای سطحی میکروبی تشخیص دهنده مولکول های ماتریکس اتصال (MSCRAMMS) قرار می گیرد. اتصال باکتری به سلول های میزبان توسط MSCRAMMS که فاکتورهای بیماری زایی مهمی هستند، انجام میشود. پروتئین A به واسطه اتصال به ناحیه Fc ایمونوگلوبولین IgG به جز IgG3 نقش مهمی در مهار پاکسازی موثر ارگانسیم توسط ایمنی هومورال دارد. از این پروتئین جهت تعیین هویت اختصاصی استافیلوکوکوس اورئوس نیز استفاده می شود برای مثال پروتئین A که به آن مولکول های IgG متصل شده است می تواند سبب آگلوتیناسیون باکتری ها گردد. این حالت کوآگلوتیناسیون نامیده میشود (۱۹،۳۴).

تصویر ۴- نقشه ژنتیکی پروتئین A



جدول ۳- MSCRAMMs در استافیلوکوکوس اورئوس

Gene	Protein	Function	Potential Implication in Disease
<i>spa</i>	Protein A	Binds antibody Fc fragment	Experimental sepsis Experimental osteoarthritis
<i>clfA</i>	Clumping factor A	Binding to fibrinogen	Experimental endocarditis
<i>clfB</i>	Clumping factor B	Binding to fibrinogen	—
<i>cna</i>	Collagen binding protein	Binding to collagen	Experimental osteomyelitis
<i>fna</i>	Fibronectin-binding protein A	Binding to fibronectin	Experimental endocarditis Cell invasion
<i>fnb</i>	Fibronectin-binding protein B	Binding to fibronectin	—
<i>sdrC</i>	Serine-aspartate repeat protein	Binding to fibrinogen	—
<i>sdrD</i>	Serine-aspartate repeat protein	Possible binding to fibrinogen	—
<i>sdrE</i>	Serine-aspartate repeat protein	Possible binding to fibrinogen	—
<i>pls</i>	Plasmin-sensitive protein	Binding to nasal mucosal cells	Colonization of nasal mucosa
<i>fntB</i>	Factor affecting methicillin resistance in the presence of Triton X-100	Putative cell wall building	Affects the expression of methicillin resistance
<i>sasA</i>	<i>S. aureus</i> surface protein A	Undetermined	—
<i>sasB</i>	<i>S. aureus</i> surface protein B	Undetermined	—
<i>sasC</i>	<i>S. aureus</i> surface protein C	Undetermined	—
<i>sasE</i>	<i>S. aureus</i> surface protein E	Undetermined	—
<i>sasF</i>	<i>S. aureus</i> surface protein F	Undetermined	—
<i>sasG</i>	<i>S. aureus</i> surface protein G	Binding to nasal mucosal cells	Associated with invasive disease
<i>sasH</i>	<i>S. aureus</i> surface protein H	Undetermined	Associated with invasive disease
<i>sasI</i>	<i>S. aureus</i> surface protein I	Undetermined	—
<i>sasJ</i>	<i>S. aureus</i> surface protein J	Undetermined	—
<i>sasK</i>	<i>S. aureus</i> surface protein K	Undetermined	—

استافیلوکوکوس ها به دلیل توانایی تکثیر و انتشار در بافت ها و تولید مواد مختلف خارج سلولی، موجب ایجاد طیف وسیعی از بیماری ها می گردند. برخی از این مواد به عنوان آنزیم در نظر گرفته می شوند و برخی نیز به عنوان توکسین (که عملکرد آنزیمی دارند) عمل می کنند (۳۴).

استافیلوکوکوس اورئوس حداقل پنج نوع توکسین سیتولیتیک یا تخریب کننده غشاء شامل توکسین های آلفا، بتا، دلتا، گاما و لکوسیدین پنتون والتین (P-V) دو نوع توکسین اکسفولیاتیو،

هشت نوع انتروتوکسین و علاوه بر این توکسین سندروم شوک توکسیک ($TsST_1$) نیز تولید می - کند (۱۹). توکسین آلفا که می تواند هم از طریق کروموزوم و هم از طریق پلاسمید کد شود ماهیچه صاف عروق خونی را تخریب نموده و برای بسیاری از انواع سلول ها مانند اریتروسیت ها، لکوسیت ها، هپاتوسیت ها، پلاکت ها و فیبروبلاست ها توکسیک می باشد. این توکسین با نفوذ در غشای سلول باعث توروم اسمزی و لیز سلول می شود. توکسین بتا که اسفنگومیلیناز C نامیده می شود، پروتئین حساس به حرارت بوده و باعث تخریب لکوسیت ها، اریتروسیت ها و فیبروبلاست ها می گردد.

توکسین دلتا یک توکسین شبیه دترجنتی بوده و فعالیت سیتولیتیکی وسیعی دارد. این توکسین اثر تخریب کننده بر روی اریتروسیت ها و بسیاری از سلول های پستانداران و ساختمان های غشاء داخل سلولی دارد. توکسین گاما ترکیبی از دو پروتئین بوده که گلبول های قرمز انسان، خرگوش و گوسفند را لیز می کند. لکوسیدین پنتون والتین (P-V) از دو جزء S (Slow-eluting) و F (Fast-eluting) تشکیل شده که جزء S به گانگلیوزید های GM1 و فسفاتیدیل کولین متصل شده و با فعال کردن فسفولیپاز A2

غشائی، محصولات مشتق از فسفولیپید ها را تولید می کند که در اثر اتصال به جزء F

کانال یونی اختصاصی پتاسیم تشکیل دهنده و باعث لیز سلول می گردد (۱۹،۳۵،۳۶).

¹Toxic shock syndrome Toxin1

توکسین های اکسفولیاتیو دارای دو شکل مجزاء (ET-B,ET-A) بوده و با عملکرد سرین پروتئازی سبب شکستن پل های بین سلولی (دسموزوم ها) می شوند. این توکسین ها به دلیل فعالیت اپیدرمولیتیک باعث ایجاد سندروم فلسی فلسی شدن پوست استافیلوکوکی (¹SSS) می گردند. ET-A مقاوم به حرارت بوده و توسط کروموزوم کد می شود. در حالیکه ET-B حساس به حرارت بوده و وابسته به پلاسمید می باشد(۱۹،۳۷).

تا کنون هشت نوع انتروتوکسین استافیلوکوکی مجزا از نظر سرولوژیکی (G-I,A-E) و سه زیرتیپ از انتروتوکسین C شناسایی شده است. این توکسین ها مقاوم به حرارت بوده و ۱۰۰ درجه سانتی گراد را به مدت ۳۰ دقیقه تحمل می کنند و همچنین به هیدرولیز آنزیم های معده مقاوم می باشند این توکسین ها توسط ۳۰ تا ۵۰ درصد سویه های استافیلوکوکوس تولید می شوند انتروتوکسین A شایع ترین عامل مسمومیت غذایی می باشد، انتروتوکسین B نیز به عنوان سوپر آنتی ژن در ایجاد سندروم شوک توکسیک نقش دارد(۳۸).

توکسین سندروم شوک توکسیک یک (TSST-1) مقاوم به حرارت و پروتئولیز بوده و ژن آن بر روی کروموزوم قرار دارد. این توکسین به عنوان سوپر آنتی ژن باعث القاء رهاسازی سایتوکین های غیراختصاصی از ماکروفاژها و لنفوسیت های T می شود. ژن مربوط به TSST-1 تقریباً در ۲۰ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس از جمله MRSA وجود دارد (۳۹،۳۴).

¹Staphylococcal sacaled syndrome

۶-۴-۱-آنزیم ها:

استافیلوکوکوس اورئوس دو نوع آنزیم تولید میکند. یک نوع آن ترشحاتی بوده و نوع دوم در سطح خارجی اکثر سویه های این باکتری به صورت متصل به دیواره وجود دارد فاکتور متصل به دیواره یا فاکتور توده ای^۱ به فیبرینوزن متصل شده، آن را به فیبرین نا محلول تبدیل می نماید واز این رو سبب توده ای شدن یا تجمع استافیلوکوکوس اورئوس می شود.

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپرو فیتیکوس بر خلاف استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز تولید نمی کنند. هر چند استافیلوکوکوس هایکوس^۲ و استافیلوکوکوس اینترمیدیوس^۳ نیز کوآگولاز تولید نمی کنند اما این باکتری ها از منابع انسانی تولید نمی شوند (۱۹).

همه استافیلوکوکوس ها با تولید کاتالاز، پراکسید هیدروژن را تجزیه کرده و به آب و اکسیژن کاتالاز می کنند. آنزیم هیالورونیداز نیز که توسط بیش از ۹۰ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس تولید می شود، با تجزیه اسید هیالورونیک بافت همبند سبب سهولت انتشار باکتری می گردد. استافیلوکیناز یا فیبرینولیزین که در همه سویه های استافیلوکوکوس اورئوس وجود دارد، سبب تجزیه فیبرین می شود. آنزیم لیپاز با تجزیه لیپیدها، در تهاجم و گسترش باکتری به بافت های جلدی و زیر جلدی نقش دارد. آنزیم نوکلئاز یک آنزیم مقاوم به حرارت بوده و نقش آن در بیماری زایینا مشخص می باشد (۱۹).

¹CLUMPING FACTOR

²S.HYICUS

³S.INTERMEDIUS

۲- تنظیم شاخص های بیماری زایی:

بیان شاخص ها و فاکتور های بیماری زایی استافیلو کوکوس ها توسط سیستم های مختلفی که به محرک های محیطی حساس هستند، تنظیم می شود. این سیستم ها متشکل از دو پروتئین^۱ حس گر کینازی و تنظیم کننده پاسخ^۲ می باشند. اتصال حسگر به لیگاند خارجی یا گیرنده اختصاصی خود

موجب فعال شدن آبشار فسفوریلاسیون و اتصال تنظیم کننده به ناحیه خاصی از DNA می شود و در

نهایت سبب فعال شدن رونویسی خواهد شد سیستم های تنظیمی دو زیر واحدی متعددی در استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شده است که از جمله این سیستم ها می توان به *LytrS*, *arlsR*, *srrAB*, *saeR* *fagr*, اشاره نمود (۳۴). ژن های تنظیمی (*agr*) نقش بسیار مهمی در کنترل Quorum-sensing بیان ژن ها برعهده دارند. این ژن ها بیان اختصاصی ادهزین های سطحی (نظیر پروتئین A، کوآگولاز و پروتئین متصل شونده به فیبرونکتین)، تولید پروتئین های مترشحه (مانند توکسین Tsst-1) را با توجه به مرحله رشد و تراکم باکتریایی کنترل می کنند. زمانی که تراکم سلولی کم است، پروموتور P2 خاموش بوده و رونویسی از پروتئین های میان غشایی، *agrB*، پیش ساز پپتیدها، *agrD*، سنسور های میان غشایی، *agrC*، و تنظیم کننده های رونویسی *agrA*، بسیار پایین می باشد. هنگامی که میزان دانسیته سلولی افزایش می یابد (در طی فاز ثابت رشدی) حسگر *agrC*، تنظیم گر *agrA* را فعال می کند.

¹Responser regulator

²Accessory global regulator

agrA یک پروتئین متصل شونده به DNA است که موجب فعال شدن پروموتور P₂ و P₃ می شود. پروموتور P₃ رونویسی از همولیزین δ و RNAIII را آغاز می کند و در نتیجه بیان ادهزین های سطحی به صورت منفی تنظیم شده و ترشح آگرو پروتئین ها در سطح رو نویسی و ترجمه افزایش می یابد. سیستم agr به وسیله پروتئین sarA¹ (یک پروتئین متصل شونده به DNA) و سایر عوامل تنظیمی کنترل می شود (۳۴، ۴۰، ۴۱).

حداقل چهار سیستم تنظیمی دو زیر واحدی که در بیان ژن های بیماری زایی استافیلوکوکوس اورئوس نقش دارند، نشان داده شده است. این سیستم ها شامل Sac (آگرو پروتئین های استافیلوکوکوس اورئوس)، srrAB (پاسخ تنفسی استافیلوکوکسی)، arlS (سنسور وابسته به اتولیز) و LytRS می باشند (۳۴).

سیستم Sae بیان ژن ها را در سطح رونویسی تنظیم کرده و فعالیت آن مستقل از سیستم agr می باشد. این سیستم نقش اساسی در تولید توکسین آلفا، همولیزین بتا و کوآگولاز دارد. سیستم srrAB نقش بسیار مهمی در تنظیم بیان فاکتورهای بیماری زایی داشته و تحت تاثیر اکسیژن قرار می گیرند. سیستم arlSR در کنترل اتولیز و همچنین کاهش فعالیت سیستم agr نقش مهمی ایفا می کند. سیستم LytRS نیز در فرآیند اتولیز دخالت دارد (۳۴، ۴۲).

۳- علائم بالینی:

توانایی و ظرفیت بیماری زایی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس بستگی به تولید توکسین ها و فاکتورهای خارج سلولی و خصوصیات مهاجمی این سویه باکتری دارد. تظاهرات بالینی برخی بیماری های استافیلوکوکوس اورئوس نتیجه فعالیت توکسین بوده، (مانند سندروم فلسی فلسی شدن پوست،

مسمومیت غذایی استافیلوکوکی و سندروم شوک توکسیک) در حالیکه سایر بیماری ها (مانند عفونت های جلدی، اندوکاردیت، پنومونی، امپیم^۱، استئومیلیت^۲ و آرتريت چرکی) ناشی از تکثیر ارگانیسم، پیدایش آبسه و تخریب بافت میباشند (۱۷).

عفونت پوست و بافت نرم، شایع ترین عفونت استافیلوکوکوس اورئوس می باشد که می تواند به لایه های بالایی پوست محدود شده (مانند سلولیت) یا ساختارهای عمقی تر را درگیر کند (مانند آبسه های بافت نرم). عفونت پوستی استافیلوکوکی با وجود علائم تاول و آبسه سیستمیک از عفونت پوستی استرپتوکوکوس گروه A متمایز می شود. آرتريت سپتیک و استئومیلیت حاد از جمله شایع ترین عفونت های استخوان و مفاصل ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس می باشند. استئومیلیت ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس به واسطه و انتشار خونی ارگانیسم به استخوان ایجاد شده یا نتیجه عفونت ثانویه حاصل از تروما یا گسترش بیماری از نواحی اطراف می باشد. اندوکاردیت استافیلوکوکی معمولاً^۳ به صورت اندوکاردیت باکتریایی حاد (ABE^۳) دیده می شود و اغلب در دریچه های طبیعی رخ میدهد (۴۳، ۱۹).

^۱Enpyema

^۲Osteomyelitis

^۳Acute bacterial endo carditis

۴- بیماری های بالینی

۴-۱- بیماری های مرتبط با توکسین

۴-۱-۱- سندرم شوک سمی

سندرم شوک سمی (TSS) به صورت اسپورادیک در سال ۱۹۲۷ به عنوان تب مخملک استافیلوکوکی گزارش گردید (۴۴). در اوایل دهه ۱۹۸۰ این بیماری نظر افراد زیادی را به خود جلب کرد. در آن هنگام موارد زیادی از TSS در زنان جوانی دیده شد که از تامپون هایی با قابلیت جذب بالا در دوران قاعدگی استفاده می کردند (۴۵). بیماری به علت تولید توکسین TSST-1 که در سویه های توکسین زا یافت می شد ، به وجود می آمد . TSST-1 می تواند از غشای موکوسی عبور کند و سپس در سراسر بدن منتشر شود ، که این قابلیت را سایر سوپرآنتی ژن ها ندارند. دو شکل بالینی TSS وجود دارد : TSS مرتبط با قاعدگی و TSS غیر مرتبط با قاعدگی.

سندرم شوک سمی مرتبط با قاعدگی :بیماری دو روز پس از شروع یا اواخر دوران قاعدگی آغاز می شود که در ارتباط با استفاده تامپون هایی با قدرت جذب بالاست. علائم بیماری شامل تب بالا ، ارتشاح مویرگی ، کاهش فشار ، هیپوآلبومینمیا ، ادم منتشره و راش های شبیه سرخک می باشد و چند روز پس از آن پوسته ریزی وجود دارد. توکسین به صورت موضعی تولید می شود و اغلب کشت های خون منفی هستند(۴۴).

سندرم شوک سمی غیرمرتبط با قاعدگی :TSS غیر مرتبط با قاعدگی امروزه به دلیل منع مصرف تامپون ها توجه زیادی را به خود جلب کرده است ارگانیزم های مسئول می توانند در هر منطقه ایی در بدن کلونیزه شوند مانند زخم های جراحی (TSS مرتبط با جراحی) ، ریه (TSS مرتبط با آنفلوانزا) ، موکوس یا پوست

(در افرادی با ایمنی سرکوب شده یا ایدزی ها) ، دیافراگم های پیش گیری از بارداری و کاتترهای دیالیزی در بیمارانی که تحت دیالیز قرار می گیرند. شکل اختصاصی زخم ها نشان می دهد که بافت های درگیر فاقد التهاب می باشند. این مورد نشان می دهد که بیماری تنها در نتیجه توکسین هایی است که از ترشح ماکروفاژها جلوگیری می کنند، به وجود می آید(۴۶).

جدول ۴- تشخیص بالینی سندرم شوک سمی استافیلوکوکی

Symptom or criterion	Description
Fever	Temperature of $\geq 38.9^{\circ}\text{C}$ (102.0°F)
Rash	Diffuse macular erythroderma
Desquamation	1-2 wk after onset of illness, particularly on the palms and soles
Hypotension	Systolic blood pressure of ≤ 90 mm Hg for adults or less than 5th percentile by age for children younger than 16 yr; orthostatic drop in diastolic pressure of ≥ 15 mm Hg from lying to sitting, orthostatic syncope or orthostatic dizziness
Multisystem involvement ^a	Gastrointestinal: vomiting or diarrhea at onset of illness Muscular: severe myalgia, or creatinine phosphokinase level at least twice the upper limit of normal Mucous membrane: vaginal, oropharyngeal, or conjunctival hyperemia Renal: blood urea nitrogen or creatinine at least twice the upper limit of normal for laboratory or urinary sediment with pyuria (≥ 5 leukocytes per high-power field) in the absence of urinary tract infection Hepatic: total bilirubin, alanine aminotransferase, or aspartate aminotransferase levels at least twice the upper limit of normal for laboratory Hematologic: platelet count less than $100,000/\text{mm}^3$ Central nervous system: disorientation or alterations in consciousness without focal neurologic signs when fever and hypotension are absent
Laboratory criteria	Negative results on the following tests, if performed: Blood, throat, or cerebrospinal fluid cultures (blood culture may be positive for <i>S. aureus</i>) Rocky Mountain spotted fever, leptospirosis, or measles
Case classification	Confirmed: a case in which all six of the clinical findings described above are present Probable: a case with five of the six clinical findings described above are present
Additional laboratory findings pathognomic for TSS, ^b but presently not included in the case definition	Isolation of <i>S. aureus</i> from a mucosal or normally sterile body site Production by an incriminated staphylococcal isolate of TSST-1 or an alternative toxin known to cause TSS Serologic susceptibility to the relevant toxin at the time of acute illness Development of antibody to the relevant toxin during convalescence

^a Three or more of these systems must be involved.

^b Proposed by Parsonnet (124) as additional criteria to be included in the case definition.

تشخیص: تشخیص TSS براساس نشانه های بالینی و آزمایشگاهی است که توسط مرکز کنترل بیماری ها (CDC) ارائه شده است. براین اساس وجود حداقل چهار ویژگی نشان دهنده ابتلا به بیماری است.

با مقایسه سندرم شوک سمی استرپتوکوکی با استافیلوکوکی مشخص می شود که با وجودیکه هردو در اثر سوپرانتی ژن ها ایجاد می شوند اما از دو جنبه متفاوتند. اول اینکه TSS استرپتوکوکی اغلب به علت عفونت های بافتی عمیق است مانند اریزی پلاس یا فاسیت نکروز دهنده که به آن " بیماری گوشتخوار"¹ می گویند. دومین تفاوت این است که میزان مرگ و میر TSS استافیلوکوکی درمان نشده ۵٪ بوده اما TSS استرپتوکوکی نزدیک به ۵۰٪ است و نیاز به درمان فوری ، جراحی و تخلیه بافت عفونی دارد(۴۷).

درمان و پیشگیری :درمان TSS شامل حذف عامل سبب از توسط آنتی بیوتیک و تخلیه بافت درگیر است. برای درمان حمایتی در صورت نیاز می توان از مایعات داخل رگی و باز کننده های عروقی² استفاده نمود. فقدان پاسخ ایمنولوژیکی به توکسین اجازه می دهد که در بیماران حساس ، توکسین فعال شود ، لذا در این موارد ، درمان ایمنولوژیکی مانند ایمنوگلوبولین های داخل عروقی (IVIG) می تواند مفید باشد (۴۸).

پیشگیری شامل عدم استفاده از تامپون هایی با قدرت جذب بالا و هم چنین جلوگیری از کلونیزاسیون استافیلوکوک در زخم و مخاط است. ناقلین استافیلوکوک در بینی را می توان با تجویز آنتی بیوتیک هایی مانند موپیروسین درمان کرد. کلونیزاسیون خارج بینی را با شستن کل بدن با آنتی سبتیک های مثل کلروهگزیدن برای حداقل یک هفته می توان از بین برد و پس از آن کشت از جهت کنترل می بایست انجام شود(۴۹).

¹Flesh eating disease

²vasopressors

به طور تقریبی ۲۰٪ ناقلین طبیعی استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن مولد توکسین TSST-1 هستند (7) ، در این ناقلین خطر کلونیزه شدن با سویه های متفاوتی از استافیلوکوکوس اورئوس مولد توکسین وجود دارد. لذا ایمنیزاسیون با واکسن TSST-1 می تواند این مشکل را برطرف کند (۵۰).

۲-۱-۴- بیان ژن های توکسین زا

بیماری سندرم شوک سمی با فعالیت سوپرآنتی ژن ها ادامه می یابد که باعث افزایش فعال سازی سیستم ایمنی می شود. تولید توکسین با سیستم agr تنظیم می گردد به طوریکه موتانت های فاقد agr قادر به تولید توکسین نیستند. بیان این ژن ها نیازمند شرایط خاص زیر می باشد: (۱) سطح بالای پروتئین ، (۲) pH نسبتاً خنثی (۸-۶/۵) ، (۳) افزایش نسبی دی اکسید کربن و (۴) افزایش نسبی فشار اکسیژن (۵۱). تمام این ۴ شرایط در قاعدگی با استفاده از تامپون هایی با قدرت جذب بالا فراهم می شود. تراکم بالای پروتئین و pH خنثی توسط پروتئین های خون و ظرفیت بالای آن ها مهیا می شود. افزایش نسبی فشار دی اکسید کربن با محتوای اتمسفری دی اکسید کربن خون تضمین می گردد. در نهایت افزایش غلظت اکسیژن به کمک تامپون ها به فلور بی هوازی واژن تحمیل می گردد. بنابراین اکوسیستم متعادل واژن ، تغییر کرده و تولید TSST-1 توسط سویه های کلونیزه شده تحریک می شود (۵۲).

همچنین شرایط ایمنولوژیک فرد نیز در بیان این توکسین ها موثر می باشند ، به طوریکه نوزادان مبتلا به سندرم شوک سمی که از ایمنی ضعیف تری برخوردارند ، علائم خفیف تری نشان می دهند.

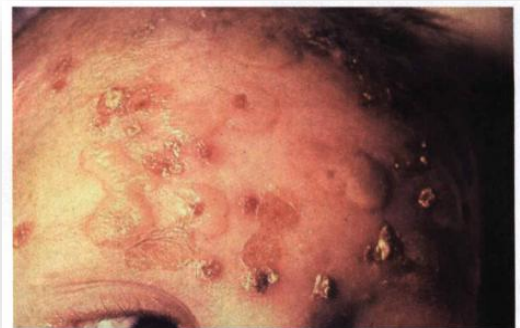
مصرف آنتی بیوتیک نیز بیان این توکسین ها را سرکوب می نماید (۵۳). سویه های تولید کننده TSST-1 در ۲۰٪ سویه های بالینی و ناقلین یافت می شود . به دلیل اینکه بیان TSST-1 نیاز به شرایط خاصی دارد شیوع بیماری سندرم شوک سمی نسبتاً پایین است (۵۲).

۳-۱-۴- سندرم فلسی شدن پوست

سندرم فلسی شدن پوست (SSSS) بیماری پوستی است که از تاول های موضعی تا پوسته شدن عمومی شدید متغیر می باشد (شکل ۷-۱۸-۱). اولین بار این بیماری توسط پزشک آلمانی بارون گاتفرید رایتر شناسایی شد که او در سال ۱۸۷۸ ، ۲۹۷ مورد را در کودکان گزارش نمود. از این رو گاهی این بیماری را "بیماری رایتر" می نامند. SSSS در نوزادان و کودکان زیر یک سال و بندرت در بزرگسالان دیده می شود. بیماری به طور طبیعی در نتیجه کلونیزاسیون پوست و مخاط توسط سویه های تولید کننده توکسین های ETA و ETB که توسط ژن های eta و etb کد می شوند به وجود می آید . ژن توکسین (eta) بر روی فاژ وژن توکسین (etb) بر روی پلاسمید قرار دارد (۵۴).



شکل ۵- . سندرم فلسی شدن پوست استافیلوکوکی.
بیماری در نتیجه تولید توکسین های اگزفولیاتیو بوده و
باکتری از پوست جدا نمی شود.



شکل ۶- سندرم فلسی شدن پوست موضعی (bulbus impetigo).
بیماری در نتیجه تولید توکسین های
اگزفولیاتیو در موضع بوده و باکتری از تاول ها جدا می
شود.

۴-۱-۴- مسمومیت غذایی

استافیلوکوکوس اورئوس دارای چندین انتروتوکسین می باشد که می توانند اختلالات معدی- روده ایی مانند استفراغ و اسهال را در مدل های پریماتی به وجود آورند. اگرچه این توکسین ها فعالیت سوپرانتی ژنی دارند اما همه آن ها نقش مشخصی در بیماریزایی ندارند. همانطور که اشاره شد SEB و SEC شایع ترین انتروتوکسین هایی هستند که با مسمومیت غذایی و سندرم شوک سمی در ارتباط هستند.

بیماری های منتقله از غذا ، مشکل بهداشتی عمومی است و ۶ تا ۸ میلیون مورد را در آمریکا در سال سبب می شود (۵۵). مسمومیت های غذایی در اثر استافیلوکوکوس اورئوس به دنبال ورود توکسین های موجود در غذا و آب به بدن ایجاد می شود. توکسین ها مقاوم به حرارت اند و با پختن غذا از بین نمی روند. بیماری معمولاً "پس از ۲ تا ۶ ساعت با خوردن توکسین همراه با علایم بی حالی ، حالت تهوع ، استفراغ ، درد شکمی و اسهال ایجاد می شود. با وجودی که تب وجود ندارد، اما علایم آن چنان شدید هستند که ۱۰٪ بیماران نیاز به بستری شدن دارند. علایم پس از ۶ تا ۱۲ ساعت خودبه خود از بین می روند و بهبودی کامل ایجاد می شود به جز در مواردی که دهیدراتاسیون شدید در کودکان و سالمندان رخ می دهد و نیاز به درمان های حمایتی وجود دارد (۵۴).

۴-۲- عفونت های پوست و بافت نرم

مهم ترین لزیون های پاتولوژیک ایجاد شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس اگزودای چرکی یا آبسه است. عفونت های پوستی و عفونت بافت نرم استافیلوکوکوس اورئوس چندین ویژگی بالینی دارد که براساس ساختار آناتومیکی آن تقسیم بندی شده است : (۱) عفونت اپیدرم که impetigo نامیده می شود (شکل ۹-۱) (۲) عفونت سطحی پوست (عفونت درم) به نام فولیکولیت (۳) عفونت عمقی پوست به نام فرونکول ،

کاربانکول و hidradentis suppurativa و ۴) عفونت زیرپوستی اریزی پلاس ، سلولیت و فاسیت) شکل ۱۰-۱).

عفونت های پوستی را می توان با مراقبت های موضعی درمان کرد و بندرت نیاز به آنتی بیوتیک خواهد داشت . عفونت های عمقی مانند لمفاژنیت ، لمفادنیت ، سلولیت و فاسیت های نکروز دهنده بیماری های شدیدی هستند که می توانند منجر به مرگ شوند. این دسته عفونت ها نیاز به درمان سیستمیک و گاهی جراحی و تخلیه و حذف بافت آلوده دارد.



- سلولیت آرنج دستتصویر ۷



تصویر ۸- لزیون های پوستی در impetigo

۳-۴- باکتری

عفونت های خونی استافیلوکوکوس اورئوس طی چند دهه اخیر افزایش قابل ملاحظه ای داشته است (۵۶). باکتری در این ارگانیسم به دو گروه تقسیم می شود: باکتری بیماری استانی که در آن کشت پس از دو روز بستری شدن در بیمارستان مثبت می شود و باکتری کسب شده از جامعه که بیشتر در بیمارانی که در شرایط خاص بالینی قرار دارند رخ می دهد. باکتری بیماری استانی به علت روش های تهاجمی در مناطق

آلوده ، عفونت زخم و پنومونی ایجاد می شود. با این وجود اغلب موارد به دلیل استفاده از کاتترهای درون عروقی و ادراری می باشد که سبب کلونیزاسیون و ایجاد عفونت می گردد (۵۷).

۴-۴- اندوکاردیت

اندوکاردیت عفونی بر روی دریچه های قلب یکی از شدیدترین عوارض باکتری می استافیلوکوکوساورئوس است. اگر درمان مناسب صورت نگیرد و دریچه تعویض نشود بیماری می تواند کشنده باشد. اندوکاردیت استافیلوکوکوس اورئوس معمولاً " باعث آمبولی سپتیک ، تخریب دریچه ها ، میوکاردیت و شوک سپتیک می شود (۵۸).

۴-۵- عفونت های تنفسی

استافیلوکوکوس اورئوس مسئول کمتر از ۱۰٪ پنومونی های برگرفته از جامعه (۵۹) و ۲۰٪ تا ۳۰٪ پنومونی های بیمارستانی می باشد (۶۰). پنومونی های اکتسابی از جامعه در اثر استافیلوکوکوس اورئوس در بیماران مسن (بالاتر از ۷۵ سال) که در خانه های سالمندان زندگی می کنند (۶۱) یا در بیمارانی با فاکتورهای زمینه ساز مانند دیابت ، اعتیاد به الکل و اغلب در اپیدمی های آنفلوانزا (۶۲) به عنوان پنومونی باکتریال ثانویه اتفاق می افتد. مرگ و میر به خصوص هنگامیکه منجر به دیسترس تنفسی یا شوک سپتیک می شود بالاست.

تظاهرات بالینی پنومونی استافیلوکوکوس اورئوس از پنومونی های سایر پاتوژن ها غیرقابل تمایز است. با این وجود پنومونی ایجاد شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس یک عفونت نکروز دهنده با پیشروی و تخریب سریع بافتی بوده که با ایجاد حفره^۱ همراه است. بیماری می تواند در نتیجه آلودگی با ائروسول ها

¹cavity

یا اسپیراسیون یا به صورت ثانویه در اثر باکتری می و اندوکاردیت باشد. در هر حال عفونت تنفسی می تواند منجر به عوارضی مانند تشکیل آبسه یا امپیم ریوی شود (۶۳).

۶-۴- آرتريت عفونی

استافیلوکوکوس اورئوس شایع ترین عامل آرتريت عفونی در کودکان و آرتريت غیرگنوکوکی در بزرگسالان است (۶۴). فاکتورهای خطر ساز در بزرگسالان آرتريت روماتوئید و دیابت محسوب می شود. آرتريت عفونی می تواند در نتیجه عفونت خونی و ترومای موضعی باشد و حتی ممکن است دلایل ایاتروژنیک^۱ (دخالت های پزشکی) داشته باشد. علایم شامل درد مزمن و تورم مفاصل است. تخریب مفاصل در نتیجه کلونیزاسیون باکتری و فاکتورهای التهابی میزبان است. بنابراین در بیمارانی با آرتريت زمینه ایی و درد مزمن در مفاصل ، بلافاصله بایستی نمونه از مایع مفصلی برای انجام کشت و آزمایشات بیوشیمیایی و شمارش سلولی گرفته شود (۶۵).

نقش در عفونت های بیمارستانی

عفونت های بیمارستانی ، همزمان با گسترش بیمارستان ها همواره یکی از مشکلات عمده بهداشتی و درمانی بوده و با افزایش طول مدت بستری شدن در بیمارستان ، موجب افزایش ابتلاء و مرگ و میر شده و در نتیجه هزینه های بیمارستانی را به شدت افزایش می دهد.

حدود ۷۰٪ عفونتهای بیمارستانی توسط هفت پاتوژن به وجود می آید ، که از میان ارگانیسهای گرم مثبت: استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی و انتروکوک ها و از میان ارگانیسهای گرم منفی : اشریشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا، انتروباکتر و کلبسیلا پنومونیه به عنوان شایعترین پاتوژن های بیمارستانی به شمار می روند (۶۶).

¹Iatrogenic

در دو دهه گذشته ، طیف عوامل بیماری زا بیمارستانی از باکتری های گرم منفی به سمت باکتری های گرم مثبت و قارچ ها سوق پیدا کرده که به بسیار مسئله ساز شده است . فاکتور مهم دیگر ظهور افزایش مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها در استافیلوکوک ها و ائتروکوک ها به عنوان عوامل بیماری زا بیمارستانی می باشد. تخمین زده می شود که میزان ابتلا بیمارستانی برای استافیلوکوکوس اورئوس ۱۶/۴ درصد در بعضی از بخش ها مثل بخش مراقبت ویژه (ICU) است (۶۷).

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده عفونتهای بیمارستانی خصوصا عفونت های ناشی از زخم های جراحی، پنومونی و باکتری می باشد. ناقلین چنین میکروبی یکی از مهمترین منابع برای عفونت محسوب می گردند. احتمال ابتلا به عفونت استافیلوکوکی در افراد ناقل بسیار زیاد است. وضعیت ناقلی بلافاصله بعد از تولد ایجاد می شود، بطوریکه ۲۴٪-۶٪ نوزادان بعد از ۳ الی ۴ روز بستری شدن در بخشهای مربوطه ناقل این باکتری می گردند. حامل بودن عوامل اپیدمیولوژیک خاصی وابسته است. بطوریکه پزشکان ۵۰٪، پرستاران ۷۰٪ و کارگران بخش های مختلف تا ۹۱٪ حامل این باکتری می باشند که بیش از جمعیت عادی (۳۵٪) است (۶۸).

استافیلوکوکوس اورئوس بویژه سویه های MRSA چالش مهمی در کنترل عفونت در بیمارستانها محسوب می شود. احتمالا علت آن نبود درمان سریع و مناسب برای سویه های MRSA می باشد. داروهای در دسترس سمی و یاگران هستند و نسبتا ناکارآمدند و مقاومت آنتی بیوتیکی گسترده ای در اکثر نمونه های تازه جدا شده مشاهده می شود. مطالعات انجام شده نشانگر وجود چرخه انتقال استافیلوکوکوس اورئوس در میان محیط، بیمار و پرسنل بیمارستانهاست، که به علت افزایش طول مدت بستری شدن بیمار در بیمارستانها ، این چرخه اهمیت پیدا کرده است (۶۸).

۵- تشخیص آزمایشگاهی:

تشخیص صحیح استافیلوکوکوس اورئوس در جنس استافیلوکوک با مشاهده کوکسی های گرم مثبت، کاتالاز مثبت، کلنی های همراه با همولیز بتا روی محیط کشت بلاد آگار حاوی خون گوسفند، تخمیر قند مانیتول بر روی محیط مانیتول سالت آگار، آزمایش کوآگولاز همراه آزمایش DNase تأیید می شود. استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی مانند استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس قادر به تخمیر قند مانیتول نبوده و از نظر آزمایش های کوآگولاز و DNase نیز منفی می باشند (۱۷، ۱۸).

برای افتراق استافیلوکوک ها می توان از آزمایش دیگری نظیر تخمیر قندهای مالتوز و تری هالوز، دیسک های افتراقی باسیتراسین، نوویوسینو پلی میکسین B، تعیین درصد نسبی اسیدهای چرب به روش کروماتوگرافی گاز- مایع تعیین ترکیب اسید تایکوئیک و اسید های آمینه دیواره سلولی و توالی پل های درون پپتیدی پپتیدوگلیکان نیز استفاده کرد (۳۴، ۱۹).

آزمایش کوآگولاز به دو صورت روی لام و لوله ای انجام می شود. در آزمایش روی لام، کوآگولاز دیواره قادر به تبدیل مستقیم فیبرینوژن به فیبرین می باشد. باکتری ها از طریق این فاکتور به فیبرینوژن متصل شده و به طور غیر مستقیم آگلوتینه میشوند. در روش لوله ای پلاسمای خرگوش را رقیق کرده باکتری را به لوله حاوی پلاسمای رقیق شده اضافه نموده و به مدت ۱ تا ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه می کنند. اگر باکتری کوآگولاز مثبت باشد، پلاسمای موجود در لوله منعقد شده و به صورت لخته مشاهده می شود (۲۸، ۱۹).

استافیلوکوکوس اورئوس در محیط مانیتول سالت آگار با تخمیر مانیتول، ایجاد اسید می کند.

این محیط دارای ۷/۵ درصد نمک و همچنین معرف فنل رد استکه در صورت ایجاد اسید، معرف از رنگ صورتی مایل به قرمز به رنگ زرد تغییر پیدا می کند (۵۰، ۶۹).

در آزمایش DNase نیز استافیلوکوکوس را بر روی محیط DNase آگار به صورت نقطه ای یا خطی کشت داد و به مدت ۱۸ یا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار می دهند. در مرحله بعد روی آن اسید کلریدریک یک نرمال می ریزند. مشاهده هاله شفاف اطراف کلنی، نشان دهنده حضور آنزیم دزوکسی ریبونوکلاز در باکتری می باشد (۶۹، ۷۰).

همچنین برای افتراق استافیلوکوکوس اورئوس از استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی، می توان از تکنیک های مولکولی نظیر هیبریداسیون در جای فلورسنت (FISH) استفاده نمود. برای طبقه بندی درون گونه ای و اهداف اپیدمیولوژیک نیز از الگوی آنتی بیوگرام، بیوتاایپینگ (پروفایل های بیوشیمیایی) فاژتایپینگ و روش های آنالیز ژنوم مانند تکنیک پالس فیلد ژل الکتروفورز استفاده می شود (۱۹).

جدول ۵-آزمایش های افتراق استافیلوکوکوس اورئوس (۲)

نوع باکتری	استافیلوکوکوس	استافیلوکوکوس	استافیلوکوکوس
آزمایش تشخیصی	اورئوس	اپیدرمیدیس	ساپروفیتیکوس
کواگولاز	+	-	-
حساسیت به نوویوسین	حساس	حساس	حساس
تخمیر قند مانیتول	+	-	-
DNase	+	-	-
همولیز	+	-	-
پلی میکسین B	مقاوم	مقاوم حساس	

بسیاری از افراد حامل استافیلوکوکوس اورئوس بر روی پوست یا بینی یا گلو خود هستند. در صورتی که پوست از استافیلوکوک پاک شود، (مانند اگزما) عفونت از طریق آبروسل به سرعت جایگزین می شود. به دلیل اینکه ارگانیسم های پاتوژن به راحتی از یک ضایعه مانند کورک به وسیله انگشتان و حتی لباس ها به سایر قسمت ها منتقل می شود، ضد عفونی کردن موضعی اهمیت خاصی در کنترل کورک های عودکننده دارد (۷۱).

عفونت های شدید پوستی (مانند آکنه و کورک)، اغلب در بالغین دیده می شود. عفونت های پوستی مشابهی در بیمارانی که به مدت طولانی تحت درمان با کورتیکواستروئیدها هستند دیده می شود. در موارد آکنه، استافیلوکوکوس اورئوس و کورینه باکترها، اسیدهای چربی را از لیپیدها جدا کرده، در نتیجه موجب آسیب و تخریب بافتی می شوند. در این موارد برای درمان از تتراسایکلین به مدت طولانی مدت استفاده می شود (۷۲).

آبسه ها و سایر ضایعات بسته چرک دار را می توان با تخلیه ضایعات و درمان آنتی بیوتیکی ریشه کن نمود. آنتی بیوتیک های متعددی در آزمایشگاه بر روی استافیلوکوکوس اورئوس موثر است از جمله پنی سیلین و تتراسایکلین، اما به دلیل اینکه ارگانیسم ها به سرعت نسبت به آنتی بیوتیک ها مقاوم می شوند و از طرف دیگر داروها توانایی نفوذ به قسمت مرکزی ضایعات نکروزه را ندارند، ریشه کنی این عفونت ها مشکل است. ریشه کنی استافیلوکوکوس اورئوس از ناقلین نیز بسیار مشکل است (۷۳).

معمولاً "استئومیلیت حاد با منشا خونی. به درمان ضد میکروبی بتا لاکتام ها خوب جواب می دهد. در استئومیلیت های مزمن و عود شونده، جراحی و برداشت بافت مرده استخوان به همراه استفاده طولانی

مدت از داروهای ضد میکروبی مانند ونکومايسن تجویز می شود. استفاده از اکسیژن با فشار بالا و پیوند پوستی عضلانی در بهبود استئومیلیت های مزمن کمک کننده است (۷۳).

عفونت هایی مانند باکتری می ، اندوکاردیت ، پنومونی و سایر عفونت های شدید ایجاد شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس را بایستی به وسیله تجویز داخل وریدی پنی سیلین های مقاوم به بتالاکتاماز درمان نمود. معمولاً از ونکومايسن در مواردی که باکتری به نفسیلین مقاوم باشد استفاده می شود. لذا در درمان سویه های MRSA استفاده از ونکومايسن از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۷۴). در سال های اخیر افزایشی در حداقل غلظت مهاری (MIC) ونکومايسن در میان سویه های MRSA جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان دیده شده که سبب گردیده پزشکان به دنبال درمان جایگزین دیگری باشند. درمان جایگزین باکتری می و اندوکاردیت ناشی از MRSA شامل آنتی بیوتیک هایی همچون داپتومايسن ، لینزولید و کوئینوپرسیتین - دالفوپرسیتین است. در صورتی که مشخص شود عفونت از طریق استافیلوکوکوس اورئوس حساس به β -لاکتاماز صورت می پذیرد ، پنی سیلین G اولین داروی انتخابی است ، ولی این سویه ها بندرت دیده می شوند. با توجه به فراوانی بالای سویه های مقاوم به دارو ، تمام سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده باید از نظر حساسیت آنتی بیوتیکی مورد بررسی قرار گیرند تا داروی مناسب برای درمان آن ها انتخاب شود. به دلیل اینکه مقاومت در برابر داروهای گروه اریترومايسین به سرعت ایجاد می شود، این داروها نباید به تنهایی برای درمان عفونت های مزمن استفاده شوند. شاخص های مقاومت آنتی بیوتیکی (مانند مقاومت به پنی سیلین، تتراسایکلین ها، آمینوگلیکوزیدها و اریترومايسین) از طریق ترانسداکشن و یا احتمالاً "کانژوگاسیون در بین استافیلوکوک ها منتقل می شود) (۷۲،۷۳).

از آنجایی که سویه های مقاوم به متی سیلین به سایر آنتی بیوتیک های بتا لاکتام و سفالوسپورین ها نیز مقاوم می باشند لذا در درمان بیماران مبتلا به عفونت با این سویه ها از رژیم های درمانی حاوی ونکومايسين و آمینو گلیکوزید ها و سایر آنتی بیوتیک های غیر بتا لاکتام استفاده می شود (۵،۶).

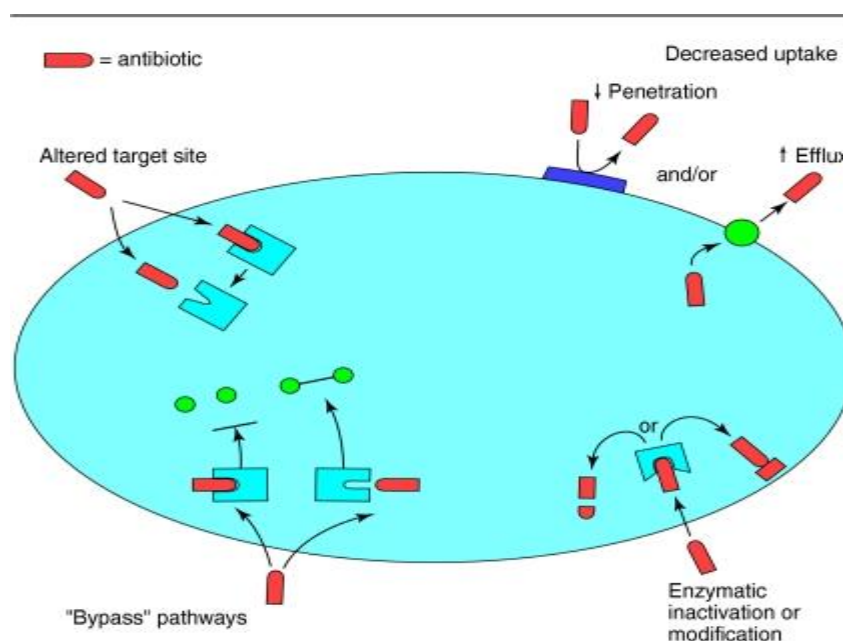
آمینوگلیکوزیدها علیرغم داشتن سمیت کلیوی و سمیت شنوایی و مشکلاتی که در ارتباط با افزایش مقاومت میکروارگانیسم ها نسبت به این داروها وجود دارد، همچنان در درمان عفونت های جدی استافیلوکوکی با ارزش هستند و نقش مهمی را در درمان و پیشگیری عفونت های ناشی از استافیلوکوک ها بازی می کنند. آمینوگلیکوزیدها از ویژگی های متعددی برخوردارند و به همین دلیل از آنها به عنوان عوامل ضد میکروبی مفید و با ارزش یاد می کنند. از میان این ویژگی ها می توان به فعالیت باکتریسیدالی وابسته به غلظت، اثر پس از مصرف آنتی بیوتیک موسوم به **post antibiotic effect (PAE)** و اثرات سینرژسمی آنها با دیگر آنتی بیوتیک ها همچون بتالاکتام ها و گلیکوپتیدها اشاره کرد (۷).

آمینوگلیکوزیدها اغلب به صورت ترکیب با بتالاکتامها و گلیکوپتیدها در درمان اندوکاردیت باکتریایی که توسط استافیلوکوک ها ایجاد می شود کاربرد دارند (۸،۹). این آنتی بیوتیکها با اتصال به زیرواحد ریبوزومی 30S باعث تداخل در سنتز پروتئین های سلول باکتری می شوند (۱۰). مقاومت به آمینوگلیکوزیدها هم در باکتریهای گرم منفی هم در باکتریهای گرم مثبت گزارش شده است.

۷- مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیکی:

باکتری ها از طریق مکانیسم های مختلف می توانند به عوامل ضد میکروبی مقاوم شوند. این روشها شامل تغییر در مسیرهای متابولیک، تولید آنزیم های غیر فعال کننده عوامل ضد میکروبی، تغییر محل های اثر آنتی بیوتیک ها و سیستم های افلاکس می باشند (تصویر ۱-۴) (۷۵،۷۶،۷۷).

استافیلوکوکوس اورئوس می تواند به اغلب آنتی بیوتیک های مورد استفاده در بالین مقاوم شود. این آنتی بیوتیک ها شامل آنتی بیوتیک های ممانعت کننده سنتز دیواره سلولی (مانند آنتی بیوتیک های خانواده بتا لاکتام و گلیکوپتید ها)، ممانعت کننده ریبوزومی مانند (ماکرولیدها، استرپتوگرامین ها، لینکوزامیدها، آمینوگلیکوزیدها و تتراسایکلین ها)، مهار کننده RNA پلی مرز (مانند ریفامپین)، مهار کننده DNA ژیراز^۱ (مانند کینولون ها) و آنتی متابولیت ها (مانند تری متو پریوم سولفامتوکسازول) می باشند (۷۸، ۷۹، ۸۰).



تصویر ۹- مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها (۸۱).

¹DNA Gyrase

۱-۷- تغییر در مسیر های متابولیک:

تغییر در مسیر های متابولیک یکی از مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها می باشد. بعضی میکروارگانیسم ها مسیرهای متابولیکی تغییر یافته ای را استفاده می کنند که واکنش مهار شده توسط عوامل ضد میکروبی را کنار می گذارند. سولفونامیدها و آنالوگ های اسید فولیک از جمله عوامل ضد میکروبی هستند که سبب مهار مسیرهای متابولیک می شوند. مکانیسم اصلی فعالیت سولفونامیدها، مهار رقابتی پارا آمینوبنزوئیک اسید (PABA) می باشد. پارا آمینوبنزوئیک اسید که در سنتز اسید فولیک دخالت دارد، برای بسیاری از میکروارگانیسم ها متابولیت ضروری می باشد. سولفونامیدها آنالوگ های سنتتیک PABA بوده و یا مهار آنزیم دی هیدروبنزوئات سنتتاز باکتری ها مانع سنتز پارا آمینو بنزوئیک اسید به عنوان پیش ساز اسید فولیک و اسید نوکلئیک می شوند. این آنزیم در سلول های پستانداران یافت نمی شود. در نتیجه سولفونامیدها انتخاب بهتری برای درمان عفونت های باکتریایی می باشند. تری متوپریم (۵،۴،۳-تری متوکسی بنزیل پیریمیدین)، دی هیدروفولیک اسید ردوکتاز را به طور بسیار کار آمدتری در باکتری ها مهار می کند. این آنزیم دی هیدروفولیک اسید را به تترا هیدروفولیک اسید (یک مرحله از سری مراحل ساخت پورین ها و در نهایت DNA) تبدیل می کند. موتاسیون هایی که تیمیدیلات سنتتاز را غیر فعال می کنند، تبدیل دی اکسی بوریدیلات به تیمیدیلات را متوقف می سازند. این موتانت ها نیاز به تیمیدین اگزوزن یا تیمیدین برای سنتز DNA دارند، بنابراین به آنتاگونیسم های مسیر سنتز فولات مثل سولفانامیدها و تری متوپریم مقاومت پیدا می کنند (۸۲،۸۳،۸۴).

۲-۷- تولید آنزیم های غیر فعال کننده عوامل ضد میکروبی:

تولید آنزیم هایی که سبب تغییر یا غیرفعال کردن عوامل ضد میکروبی می شوند، یکی دیگر از مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیکی می باشند. بتالاکتامازها، آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزید ها

و کلرامفنیکل استیل ترانسفراز از جمله این آنزیم ها هستند (۸۵، ۸۴).

۱-۲-۷- بتالاکتامازها: آنزیم هایی هستند که با شکستن حلقه بتالاکتام از طریق هیدروکسیلاسیون برگشت ناپذیر پیوند آمیدی سبب غیر فعال شدن دارو های بتالاکتام می شوند و در نتیجه آن سلول به اثر بتالاکتام ها مقاوم می شود، تا کنون تعداد متنوعی از بتالاکتامازها شناسایی شده و همچنین طرح طبقه بندی با توجه به خواص شیمیایی و فیزیکی برای آن توصیف شده است. تا همین اواخر سیستم طبقه بندی

ارائه شده توسط ریچموند^۱ و سای کس^۲ به طور گسترده ای برای طبقه بندی بتالاکتامازها توسط بوش^۳ تدوین شده است (۸۵). بتالاکتامازها یک مکانیسم مقاومت مشترک، در بین ارگانیسم های گرم مثبت و گرم منفی، هوازی و بی هوازی می باشند. در باکتری های گرم منفی دارو های بتالاکتام از طریق کانال های پورین وارد سلول می شوند و در پری پلاسمیک با آنزیم های بتالاکتاماز مواجه می شوند. بتالاکتامازها مولکول های بتالاکتام را قبل از اینکه آنها شانس رسیدن به PBP داشته باشند، نابود می کنند. در باکتری های گرم مثبت بتالاکتامازها به فضای خارج سلولی در اطراف باکتری ترشح می گردند و قبل از اینکه بتالاکتام ها بتوانند وارد سلول شوند، آن ها را نابود می سازند (۸۶، ۸۴).

¹Richmond

²Sykes

³Bush

۷-۲-۲- آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزید ها:

آمینوگلیکوزیدها گروهی از دارو های دارای خصوصیت مشترک شیمیایی، ضد میکروبی، فارماکولوژیکی و سمی می باشند. در حال حاضر این گروه شامل استرپتومایسین، نئومایسین، کانامایسین، جنتامایسین، توبرامایسین و غیره می باشند. همگی سنتز پروتئین باکتری ها را از طریق اتصال و جلوگیری از فعالیت زیر واحد 30S ریبوزوم باکتریایی مهار می کنند. باکتری ها می توانند با تولید آنزیم های آدنیلات، فسفوریلات و استیلات سبب تغییر و غیر فعال شدن آمینوگلیکوزید ها شوند (۳۴،۸۵).

۷-۲-۳- کلرامفنیکل استیل ترانسفراز:

کلرامفنیکل مهار کننده قوی پروتئین در میکروارگانیسم ها می باشد. این دارو با تداخل در فعالیت پپتیدیل ترانسفراز، مانع از اتصال اسید های آمینه به زنجیره پپتیدی در زیر واحد 50S ریبوزومی می شود. باکتری ها می توانند با تولید استیل ترانسفراز به کلرامفنیکل مقاوم شوند (۳۴).

۷-۳- تغییر محل های اثر آنتی بیوتیک ها

مکانیسم سوم مقاومت به عوامل ضد میکروبی در باکتری ها، تغییر محل های اثر آنتی بیوتیک ها می باشد. باکتری ها با تغییر سایت های هدف به مهار آنتی بیوتیکی مقاوم می شوند در حالیکه همچنان به هدف اولیه حساس هستند (۸۷).

۷-۳-۱- پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین (PBP_s):

محل اتصال آنتی بیوتیکهای بتالاکتام، گروهی از آنزیم های (پپتیدوگلیکان ترانس پپتیداز) به نام پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین (PBP_s) میباشد. این آنزیم ها و PBP ها برای سنتز و حفظ دیواره سلولی باکتری حیاتی هستند. اتصال یک آنتی بیوتیک بتالاکتام به PBP، سبب مرگ سریع سلول می شود. این پروتئین توسط ژن *mecA* کد می شود (۳۴،۸۷).

PBP ها در باکتری های گرم مثبت و گرم منفی ممکن است به گونه ای توسط موتاسیون تغییر پیدا کنند که بتالاکتام ها دیگر نتوانند به آنها متصل گردند. بنابراین سلول ها به این آنتی بیوتیک ها مقاوم می شوند. برخی از باکتری ها با تغییر ساختار PBP های خود به طوری که تمایل کمتری برای اتصال به این آنتی بیوتیک ها دارند، به این عوامل ضد میکروبی مقاوم می شوند. استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از این مکانیسم و تولید PBP₂ (PBP_{2a}) به متی سیلین مقاوم می شود.

ساختار PBP_{2a} به گونه ای است که توسط آنتی بیوتیک هایی نظیر پنی سیلین مهار نمی شود و سلول همچنان به سنتز پپتیدوگلیکان ادامه می دهد (۸۷).

۲-۳-۷-ریبوزوم ها:

متیلاسیون RNA ریبوزومی می تواند سبب مقاومت به ماکرولیدها در باکتری گردد. تغییر در ریبوزوم بر اثر ژن های erm (اریترو مایسین میتلاز) ایجاد می شود. این ژن ها آنزیم های میتلازی را کد می کنند که می تواند یک یا دو گروه متیل را به 23srRNA اضافه کند. این امر موجب ایجاد تغییر استری^۱ در ساختار ریبوزوم میشود به طوری که میل پیوندی دارو را بسیار کاهش می دهد. ژن های erm بر روی عناصر متحرک مانند ترانسپوزون ها (مثل ermA در Tn₅₅₄) یا پلاسمید ها (مثل ermC در PE194) قرار گرفته اند، البته بیان ژن های فوق به صورت القایی انجام می گیرد. آنزیم میتلازی که به صورت ژن erm کد می شود، فقط در حضور داروی القاگر سنتز خواهد شد. بنابراین باکتری، انرژی متابولیکی خود را در غیاب فشار انتخابی آنتی بیوتیکی هدر نمی دهد (۸۸).

۳-۳-۷-DNA ژیراز و توپوایزومراز ۴:

کینولون ها، آنالوگ های سنتتیک نالدیکسیک اسید میباشند. مکانیسم فعالیت تمامی کینولون ها مهار سنتز DNA ژیراز و توپوایزومراز ۴ می باشد. موتاسیون در ژن کروموزومی DNA ژیراز و توپوایزومراز ۴ می تواند سبب مقاومت به کینولون ها در باکتری ها گردد (۸۹).

۴-۷-پمپ های افلاکس:

اولین بار پمپ افلاکس مقاومت چند گانه^۲ به نام P-Glycoprotein توسط جولیانو^۳ و لینگ^۴ توصیف گردید، این پمپ که وابسته به هیدرولیز ATP بود سبب ایجاد مقاومت نسبت به طیفگسترده ای از ترکیبات از جمله عوامل شیمی درمانی مورد استفاده جهت درمان سرطان می شد. در دهه های اخیر به طور گسترده ای مقاومت به واسطه پمپ های افلاکس مقاومت چند گانه گزارش شده است (۹۰،۹۱،۹۲). بر خلاف سایر ژن های مقاومتی که توسط پلاسمید کد می شوند و مقاومت به یک آنتی بیوتیک ویژه را ایجاد می کنند، ژن های پمپ های افلاکس در تمام موجودات زنده وجود دارند (۹۳). در اواخر دهه ۱۹۸۰ و اوایل ۱۹۹۰ مشخص شد که سیستم های افلاکس مقاومت چند گانه در میکروب ها نیز انتشار دارند. اولین پروتئین های انتقال دارویی که در باکتری ها شناخته شده یک خانواده از پمپ های افلاکس ترا سایکلین بود که مقاومت گسترده های را به آنتی بیوتیک های تتراسایکلین در باکتری های گرم مثبت و گرم منفی ایجاد می کرد.. اکنون پنج خانواده از این پمپ ها در پروکاریوت ها شناسایی شده اند که سبب ایجاد مقاومت به بسیاری از آنتی بیوتیک ها می شوند (۹۴،۹۵،۹۶).

¹Esteric modification

²Multidrug efflux

³Juliano

⁴ling

پمپ های افلاکس آنتی بیوتیکی در باکتری ها از نظر فیلو ژنی به پنج خانواده بزرگ تعلق دارند که شامل موارد زیر می باشند.

(ABC)ATP binding
cassette.1(RND)Resistant nodulation divition.4
super family.3
(MATE) Multidrug and toxic efflux.5

در تمامی این خانواده ها ، سیستم افلاکس دارو وابسته به انرژی فعال بوده و از انرژی ATP و یا نیروی انتقال پروتون استفاده می کند. سیستم افلاکس ABC وابسته به هیدرولیز ATP (انتقال فعال اولیه) می باشد در حالیکه سیستم های RND, SMR, MFS پمپ های افلاکس انتقال دهنده پروتون می باشند و پمپ افلاکس $MATE$ ، سیستم آنتی پورت دارو یا H^+Na^+ (انتقال فعال ثانویه) می باشد (۹۷،۹۸).

۸-مقاومت آنتی بیوتیکی:

مقاومت به آنتی بیوتیک های خانواده بتالاکتام:

آنتی بیوتیک های خانواده بتالاکتام از طریق اتصال به آنزیم های ترانس پپتیداز و ترانس گلیکوزیداز از سنتز دیواره سلولی باکتری ها جلوگیری می کنند. ترانس پپتیداسیون در انتهای D - آلانین D - آلانین پیش ساز پپتیدوگلیکان اتفاق می افتد و یا جدا شدن D - آلانین انتهایی، اسید آمینه چهارم به اسید آمینه سوم رشته مقابل متصل می شود. پنی سیلین ها و سایر آنتی بیوتیک های بتالاکتام به عنوان آنالوگ های D - آلانین - آلانین انتهایی پیش سازهای پپتیدوگلیکان عمل می نمایند.

این آنتی بیوتیک ها با آنالوگ های فوق برای اتصال به آنزیم های ترانس پپتیداز رقابت می کنند. بنابراین به این آنزیم ها آنزیم های متصل شونده به پنی سیلین ($PBPs^1$) نیز می گویند (۹۹).

۸-۱- مقاومت به پنی سیلین:

عمده ترین مکانیسم مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی بیو تیک های خانواده بتالاکتام، تولید آنزیم پنی سیلیناز می باشد. این آنزیم توسط ژن BlaZ که معمولاً روی پلاسمید قرار می گیرد کد می شود. پنی سیلیناز نوعی آنزیم است که موجب تجزیه پنی سیلین به اسید پنی سیلوئیک می شود. پس از معرفی پنی سیلین در اواسط دهه ۱۹۴۰، ایزوله هایی در بیمارستان و جامعه بسیار شایع هستند و تا ۸۰ درصد از ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس را به خود اختصاص می دهند (۹۴،۱۰۰).

۸-۲- مقاومت به متی سیلین:

مقاومت به متیسیلین توسط یک قطعه کروموزومی تحت عنوان SCCmec ایجاد می شود که حاوی ژن *mecA* می باشد. این ژن پروتئینی تحت عنوان PBP2a تولید می کند که تمایل کمی برای اتصال به داروهای بتالاکتام دارد، و توسط این دارو ها مهار نمی شود. تا کنون پنج تیپ مختلف از SCCmec شناسایی شده است که اندازه آن ها از ۲۰Kb تا ۶۸Kb متغیر می باشد. در بین تیپ های مختلف SCCmec خطرناک ترین آنها تیپ III می باشد. البته برخی از استافیلوکوکوس ها، دارای حساسیت بینا بینی نسبت به متی سیلین هستند زیرا آنزیم پنی سیلیناز را بیش از اندازه تولید می کنند. با این وجود، ایزوله های دارای حساسیت بینابینی نسبت به متی سیلین از نظر بالینی اهمیتی ندارند (۱۰۱،۱۰۲). از آنجایی که PBP2a میل پیوندی پایینی برای آنتی بیو تیک های بتالاکتام دارد، هنگامی که آنتی بیو تیک های بتالاکتام فعالیت PBP را متوقف می سازند، سنتز دیواره سلولی را به عهده می گیرد، PBP2a به پیش سازهای خاصی جهت سنتز دیواره سلولی احتیاج دارد.

این پیش سازها شبیه پیش سازهای پپتیدو گلیکان می باشند، با این تفاوت که در آنها پنتا گلیسین به L- لیزین در موقعیت سوم اتصال یافته است و D- گلوتامین در موقعیت دوم، دچار آمیداسیون شده است. علاوه بر این، PBP2a برای عملکرد مناسب به عوامل ژنتیکی دیگری نیز نیاز دارد. این عوامل از ۲۰

شاخص ژنتیکی گوناگون تشکیل شده اند و بعضی از آنها، مسئول اضافه نمودن واحدهای گلیسین به PBP2a می باشند. هرگونه تغییر در این شاخص های ژنتیکی حتی در صورت وجود PBP2a، منجر به کاهش مقاومت نسبت به متی سیلسن خواهد شد. از آنجایی که بیشتر آنتی بیو- تیک های بتالاکتام PBP های معمول استافیلوکوکوس اورئوس را مورد هدف قرار می دهند، لذا می- توان تحقیقات را فقط بر روی مهار کننده های PBP2a متمرکز کرد، تحقیقات تجربی و شواهد کریستالوگرافی نشان می دهند که چنین روی کردی کاملاً^۱ امکان پذیر می باشد (۷۸،۱۰۳).

ایزوله های مقاوم به متی سیلسن استافیلوکوکوس اورئوس (MRSA) به دو دسته بزرگ اکتسابی از جامعه (CA-MRSA^۱) و سویه های اکتسابی از بیمارستان (HA-MRSA^۲) تقسیم بندی می شوند.

اگرچه اولین ایزوله های مقاوم به متی سیلین، ابتدا در بیمارستان ها به وجود آمدند اما پس از مدتی، ایزوله های مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه نیز پا به عرصه ظهور گذاشتند. ابتدا تصور می شد که این کلو ن ها از ایزوله های بیمارستانی منشأ گرفته باشند اما بعد ها مشخص شد که ایزوله های CA-MRSA به طور جدا گانه تکامل پیدا کرده اند. از سوی دیگر، ایزوله های HA-MRSA دارای مقاومت چند گانه به انواع مختلف آنتی بیوتیک ها بوده و معمولاً^۱ مرتبط با فاکتور های مستعد کننده ای مانند بستری شدن در بیمارستان و استفاده از کاتتر و غیره می باشند. در حالیکه ایزوله های

CA-MRSA به تعداد بسیار کمتری از آنتی بیو تیک ها مقاوم می باشند و غالباً^۱ منشأ پلی کلو نال دارند. ایزوله های CA-MRSA در عفونت های جلدی و پنومونی شدید در افراد سالم هستند. اگر چه ایزوله های CA-MRSA و HA-MRSA، هر دو دارای SCCmec (در بر گیرنده ژن mecA) می باشند.

¹Community-acquired MRSA

²Hospital-acquired MRSA

اما SCCmec در آنها از نظر اندازه و منشاء پیدایش کاملاً^۱ متفاوت از یکدیگر می باشد. بنابراین، این دو نوع

ایزوله هیچ شباهتی به یکدیگر ندارند. نوع SCCmec IV در سویه های MRSA

اکتسابی از جامعه شیوع بیشتری دارد (۱۰۵، ۱۰۴). امروزه برای ارزیابی مقاومت به متی سیلین از دیسک های اگزا سیلین در آزمایشگاه میکروب شناسی استفاده می شود. پایداری اثر بخشی اگزا سیلین با گذشت زمان و احتمال بالای شناسایی سویه های با مقاومت نا همگون^۱ توسط اگزا سیلین از جمله دلایل استفاده روزمره از دیسک های اگزا سیلین به شمار می رود. علاوه بر این از نظر تجاری اگزا سیلین به جای متی سیلین عرضه می گردد و اصولاً^۱ در حال حاضر در پزشکی متی سیلین ارزش درمانی ندارد. اگرچه نباید فراموش کرد که از لحاظ تاریخی واژه مقاومت به متی سیلین همان مقاومت به اگزا سیلین به شمار می آید، در ادبیات میکروب شناسی جایگاه ویژه ای دارد. شاید در برخی متون، دانشمندان تلاش می کنند از واژه مقاومت به اگزا سیلین به جای مقاومت به متی سیلین استفاده کنند. در حال حاضر امروزه اصطلاح سویه های مقاوم به متی سیلین که در واقع در آزمایشگاه تعیین حساسیت آن ها توسط دیسک های اگزا سیلین صورت گرفته، همچنان رایج می باشد (۱۰۶).

۳-۸- مقاومت به کینولون ها

کینولون ها در دهه ۱۹۶۰ از ترکیبات ضد مالاریایی کینینه عنوان یک محصول فرعی به دست آمدند. مشتقات فلور دار کینولون ها مانند سیپروفلوکساسین، نوروفلوکساسین و اوفلوکساسین در دهه ۱۹۸۰ معرفی شدند. استفاده از آنتی بیوتیک های فوق علیه پاتوژن های گرم مثبت مانند ایزوله های MRSA

¹Hetro resistance

می تواند منجر به مقاوم شدن آنها در برابر این آنتی بیوتیک ها شود. در حال حاضر، مقاومت نسبت به کینولون ها در ایزوله های MRSA را شاید بتوان حدود ۹۰ درصد تخمین زد (۱۰۷، ۱۰۸). مقاومت نسبت به کینولون ها بر اثر موتاسیون های کروموزومی ایجاد می شود این نوع مقاومت از طریق دو مکانیسم امکان پذیر است که شامل بیان بیش از حد پمپ افلاکس *norA* و ایجاد موتاسیون های ساختاری در ژن های کد کننده آنزیم توپوایزومراز IV (*grLB, gyrB*) و آنزیم ژیراز (*gyrA, gyrB*) می باشند. البته این نوع از مقاومت، مرحله به مرحله ایجاد می شود. ابتدا موتاسیون در ژن *griA* ایجاد می شود و این موتاسیون اولیه، راه را برای ایجاد موتاسیون ثانویه در ژن *ggrA* فراهم می نماید. ایزوله هایی که هر دو نوع موتاسیون را دارند دارای مقاومت بسیار بالایی نسبت به کینولون ها می باشند. از آنجایی که ایزوله های دارای موتاسیون اولیه در ژن *griA* می توانند بعد ها دچار موتاسیون ثانویه در ژن *gyrA* شوند لذا ابتدا باید از گسترش ایزوله های فوق جلو گیری نمود بنابراین تشخیص ایزوله های دارای موتاسیون های اولیه بسیار حائز اهمیت می باشد. علاوه بر این، سیستم های افلاکس به ویژه پمپ افلاکس *norA* که سبب دفع آنتی بیو تیک و کاهش غلظت درون سلولی آن در باکتری می شوند، نقش بسزائی در مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس به سیپروفلوکساسین ایفا می کنند (۱۰۹، ۱۱۰).

۴-۸- مشتقات هگزا هیدروکینولین:

مشتقات هگزا هیدروکینولین در طی مراحل مختلف از تغییر ساختمان ۱و ۴- دی هیدرو پیریدین به دست آمده اند. در جدول ۱-۳- ساختمان دو مشتق ۳- الکیل استری هگزا هیدروکینولین (4-7b-3, 7b-4) قابل مشاهده می باشد (۱۱۱).

جدول ۶- ساختمان دو مشتق هگزا هیدرو کینولون (7b-3, 7b-4)

مشتق هگزا هیدرو کینولون	Ar	R
7b-3	4-chlorophenyl	i-propyl
7b-4	4- chlorophenyl	t-butyl

۵-۸- آمینو گلیکوزیدها و مکانیسم های مقاومت

آمینو گلیکوزیدها آنتی بیوتیکهای وسیع طیفی هستند که باعث افزایش میزان اشتباه ریبوزوم و جلوگیری از مراحل ترجمه می شوند. اگر چه تمام آمینو گلیکوزیدها بر روی زیر واحد کوچک ریبوزوم اثر می گذارند ولی مکانیسم مهار سنتز پروتئین در داروهای مختلف با هم متفاوت است. این آنتی بیوتیکها با اتصال به زیر واحد ریبوزومی 30S باعث تداخل در سنتز پروتئین های سلول باکتری می شوند (۷، ۱۲).

آمینو گلیکوزیدها از ویژگی های متعددی برخوردارند و به همین دلیل از آنها به عنوان عوامل ضد میکروبی مفید و با ارزش یاد می کنند. از میان این ویژگی ها می توان به فعالیت باکتری سیدالی وابسته به غلظت، اثر پس از مصرف آنتی بیوتیک موسوم به (PAE) و اثرات سینرژیسمی آنها با دیگر آنتی بیوتیکها همچون بتالاکتامها و گلیکوپپتیدها اشاره کرد (۷).

آمینو گلیکوزیدها اغلب به صورت ترکیب با بتالاکتامها و گلیکوپپتیدها در درمان اندوکاردیت باکتریایی که توسط استافیلوکوک ها ایجاد می شود کاربرد دارند (۸، ۹). مقاومت به آمینو گلیکوزیدها هم در باکتریهای گرم منفی هم در باکتریهای گرم مثبت گزارش شده است (۱۰).

مکانیسم های متفاوتی در ایجاد مقاومت نسبت به آمینو گلیکوزیدها شناسایی شده است که مهمترین آنها عبارتند از:

۱- تغییر هدف در جایگاه ریبوزومی اتصال دارو، ۲- پمپ افلاکس، ۳- کاهش در نفوذپذیری و دریافت دارو
۴- تغییر 16SrRNA به واسطه متیلازها و ۵- آنزیمهای تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها (AMEs).

در مواردی ممکن است بیش از یک مکانیسم در یک زمان در باکتری در ایجاد مقاومت نقش داشته باشد. با این وجود، تولید آنزیمهای تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها (AMEs) از جمله شایعترین مکانیسم مقاومت در آمینوگلیکوزیدها محسوب می شوند که با تولید آنزیم های مخرب این داروها از جمله آمینوگلیکوزید استیل ترانسفراز (AACs)، آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفراز و (ANTs) آمینوگلیکوزید فسفو ترانسفراز (APH) صورت می گیرد.

مکانیسم غیرفعال سازی آنزیمی دارو که به عنوان اصلی ترین مکانیزم مقاومت هم در باکتری های گرم مثبت و هم در باکتری های گرم منفی شناخته شده است، اصلی ترین مکانیسم

مقاومت به آمینوگلیکوزید ها در گونه های استافیلوکوکی نیز می باشد. این آنزیمها به سه رده مختلف بر اساس فعالیت تغییر دهنده شان طبقه بندی می شوند که شامل:

- آمینوگلیکوزید استیل ترانسفرازها (AACs)

- آمینوگلیکوزید فسفریل ترانسفرازها (APHs)

- آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفرازها (ANTs) هستند (۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴).

این سه آنزیم توسط ژنهای (ant(4')-Ia , aph(3')-IIIa, aac(6')-Ie-/aph-(2'') این سه آنزیم کد میشوند (۱۵-۱۶).
(۸).

ژنهای کد کننده آنزیمهای تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها معمولاً بر روی عناصر ژنتیکی متحرک چون پلاسمیدها و یا تراسپوزون ها قرار گرفته اند (۹). و به طور وسیعی در بین باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی منتشر می شوند (۹، ۳۴، ۸۵).

۹- اهمیت روش های مولکولی:

روش های مولکولی به دلیل دارا بودن سرعت بالا جایگاه ویژه ای در تکنیک های تشخیصی اولیه دارند. کاربرد این روش ها در تشخیص بیماری های مختلف از اهمیت ویژه ای برخوردار بوده و در بعضی از مراکز آزمایشگاهی به عنوان روش های تشخیصی تکمیلی در کنار سایر آزمایش های روتین مورد استفاده قرار می گیرند (۱۱۲).

روش های مرسوم تشخیص میکروبی صرفاً "بر ویژگی های فنوتیپی ارگانسیم تکیه می کنند. اگر چه برخی از ویژگی های فنوتیپی مانند پروفایل ایزوآنزیم، حساسیت آنتی بیوتیکی و تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی اسید های چرب سلولی، دارای ویژگی های کافی برای تشخیص سویه میکروبی هستند، اما با این وجود اغلب ویژگی های فنوتیپی مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی، حساسیت کافی برای تشخیص سویه را ندارند (۱۱۳، ۱۱۲).

از زمانی که روش های تجزیه و تحلیل ژنوم میکروبی در دسترس قرار گرفتند، فصل جدیدی در شناسایی خصوصیات میکروبی آغاز گردید. با وجود اینکه اسید دزوکسی ریبونوکلیک (DNA) در اواخر دهه ۱۹۶۰ کشف گردید، ولی تا شناسایی آنزیم های محدودالثر و تکنیک های DNA نو ترکیب در دهه ۱۹۷۰ مورد استفاده قرار نگرفت. در طول این زمان، بسیاری از دانشمندان در حال تلاش برای کشف رموز راز نهفته در DNA بودند. در سال های اخیر، توسعه و استفاده از روش های تشخیصی مولکولی، انقلابی در تشخیص و

کنترل بیماری های عفونی ایجاد کرده است. سیستم های مبتنی بر PCR برای تشخیص مستقیم عوامل بیماری زا نمونه های بالینی و بدون نیاز به کشت، در تشخیص سریع میکرو ارگانیسم های غیر قابل کشت و یا سخت رشد حائز اهمیت می باشند. علاوه بر این تجزیه و تحلیل تکثیر توالی DNA میکروبی، شناسایی و توصیف بهتر پاتوژن را میسر می سازد. با توجه به پیشرفت های قابل توجه در روش های تشخیص مولکولی در سالیان اخیر و همچنین کاهش خطر آلودگی، کاهش هزینه ها و سریعتر بودن این روش ها نسبت به روش های مرسوم، روش های مولکولی پتانسیل جایگزینی روش های تشخیصی مرسوم در میکروب شناسی را دارند. امروزه روش های مولکولی فصل جدیدی در میکروب شناسی باز نموده اند که تحت عنوان میکروب شناسی مولکولی به تشخیص عوامل بیماری زا، مکانیسم های بیماری زایی و غیره می پردازند (۱۱۴، ۱۱۳).

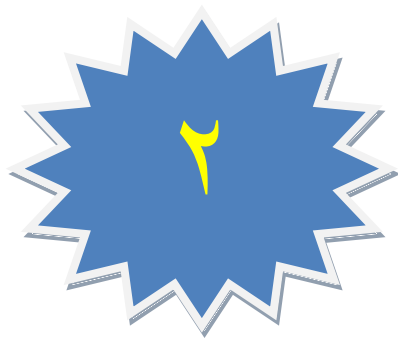
۱-۹- به کارگیری PCR

واکنش PCR اولین بار توسط Mullis در سال ۱۹۸۴ توصیف شد. این واکنش بهترین روش، جهت تکثیر قطعه ای از DNA ژنوم به میلیون ها کپی در طی مدت زمان کوتاه می باشد. از این تکنیک در مهندسی ژنتیک، بیولوژی مولکولی، تشخیص سرطان های مختلف، تعیین هویت، جرم شناسی، تعیین ترادف، باستان شناسی و غیره استفاده می شود (۱۱۵).

واکنش PCR شامل سه مرحله می باشد که در طی آن ابتدا DNA دو رشته ای هدف واسرشته می شود. سپس پرایمر ها به مکمل خود روی DNA تک رشته ای اتصال می یابند. آنگاه در طی یک واکنش آنزیمی پلیمریزاسیون توسط آنزیم Taq پلی مرز، رشته جدید به طور کامل سنتز می شود. با تکرار این مراحل (۴۰-۲۵ سیکل) در نهایت میلیون ها کپی از سکانس DNA هدف سنتز می شود. هر یک از مراحل واکنش PCR در دمای ویژه ای انجام می شود. معمولاً "مرحله ی Denaturation در دمای ۹۴ درجه

سانتی گراد و مرحله Extension در دمای ۷۲ در جه سانتی گراد (دمای بهینه برای فعالیت آنزیم Taq پلی مراز) انجام می شود. دمای مرحله اتصال پرایمرها (Annealing) به قطعه مکمل خود در DNA تک رشته ای، به سکانس آنها و دیگر شرایط واکنش بستگی دارد (۱۱۵، ۱۱۶).

پرایمرها قطعات کوتاهی از DNA به طول ۱۸-۳۰ نوکلئوتید هستند که مکمل بخش هایی از DNA هدف می باشند. پس از جدا شدن دو رشته ی DNA در حرارت بالا، پرایمرها با کاهش دما به سکانس های مکمل خود متصل می شوند. پرایمرها در واقع جایگاه شناسایی آنزیم پلی مراز جهت شروع همانند سازی هستند. آنزیم Taq پلی مراز نوکلئوتیدهای بعدی مکمل DNA هدف را با استفاده از دزوکسی ریبونوکلئوتیدها (dNTPs) می سازد و بدین ترتیب رشته DNA مکمل قطعه هدف سنتز می شود. اصول واکنش PCR در واقع از تکثیر DNA در داخل سلول زنده اقتباس شده است (۱۱۵، ۱۱۶).



بخش دوم

اهداف و فرضیات

هدف اصلی

تعیین فراوانی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آمینوگلیکوزیدها در نمونه های جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان های آموزشی قزوین و تهران به دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی.

اهداف فرعی

- تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی گونه های استافیلوکوکوس اورئوس به روش دیسک آگار دیفیوژن مطابق با روش استاندارد CLSI.
- تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) جنتامایسین با استفاده از آگاردایلوشن.
- تعیین فراوانی ژن های کد کننده ی "ant(4')-Ia" در سویه های جدا شده از عفونت های استافیلوکوکوس اورئوس.
- تعیین فراوانی ژن های کد کننده ی aph(3')-IIIa در سویه های جدا شده از عفونت های استافیلوکوکوس اورئوس.*
- تعیین فراوانی ژن های کد کننده ی (2") [aac-(6')-Ie-/aph] در سویه های جدا شده از عفونت های استافیلوکوکوس اورئوس.
- تعیین فراوانی مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده در هر بیمارستان به طور جداگانه.
- تعیین فراوانی مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده بر حسب نمونه کلینیکی.
- مقایسه بین الگوی مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس در بیمارستانهای مختلف با یکدیگر.

- مقایسه نتایج فنوتیپیک با نتایج ژنوتیپیک

اهداف کاربردی

- از آنجایی که الگوی مقاومت دارویی دارای توزیع جغرافیایی، منطقه ای و حتی بیمارستانی می باشد. لذا تعیین الگوی مقاومتی سویه های استافیلوکوکی جدا شده از عفونت های بیمارستانی به روش فنوتیپی و تعیین فاکتور های ژنتیکی آن در این سویه هامی تواند در تعیین رژیم درمانی مناسب برای بیماران و ارایه نتایج آن به کمیته های کنترل عفونت بیمارستان ها از جهت کنترل سویه های دارای مقاومت چند گانه و همچنین بررسی های اپیدمیولوژیک موثر باشد

- فرضیه ها یا سؤال های پژوهش:

- مقاومت به جنتامایسین در چند درصد از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده می شود ؟
- چند درصد از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن "la-(4')-ant می باشند؟
- چند درصد از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن IIIa-(3')-aph می باشند؟
- چند درصد از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن "aac-(6')-le-/aph(2'') می باشند؟
- آیا تفاوتی میان نتایج مقاومت به جنتامایسین با روش فنوتیپی و ژنوتیپی وجود دارد؟
- آیا بین الگوی مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده در بیمارستانهای مختلف تفاوتی وجود دارد؟



بخش سوم

بررسی متون

۱ - Ida و همکاران در سال ۲۰۰۱ در ژاپن ۳۸۱ ایزوله استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی سیلین را از نظر مقاومت به آمینوگلیکوزیدها با روش فنوتیپی آگاردایلوشن و روش ژنوتیپی PCR بررسی کردند و فراوانی ژن $[aac(6')-Ie-aph(2'')]$ را (۶۱/۷٪)، ژن $ant(4')-Ia$ (۸۴/۵٪) و ژن $aph(3')-IIIa$ را (۸/۹٪) گزارش کردند (۱۱۷).

۲ - شفیع ثابت و همکاران در سال ۲۰۰۷ در مالزی مطالعاتی را بر روی ۱۵۲ ایزوله استافیلوکوک انجام دادند و ۹۳ سویه (۶۱/۲٪) را با تعیین ژن *FemA* به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس گزارش کردند. نتایج مطالعه نشان داد که ۴۸ سویه (۵۱/۶٪) دارای مقاومت به متی سیلین بوده و تمامی این سویه ها (۱۰۰٪) دارای مقاومت به جنتامایسین و کانامایسین با روش های فنوتیپیک گزارش شده اند. در این مطالعه حداقل غلظت مهاری برای جنتامایسین (MIC > 128-256 ug/ml) و برای کانامایسین (MIC > 64-256 ug/ml) تعیین گردید و در تمامی این سویه ها (۱۰۰٪) وجود ژن $aac(6')-Ie-aph(2'')$ (گزارش شد (۱۱۸).

۳- فتح ا...زاده و همکاران در سال های ۲۰۰۶-۲۰۰۵ در ایران ۱۰۹ ایزوله استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی سیلین را از نظر مقاومت به آمینوگلیکوزید با روش فنوتیپی دیسک دیفیوژن و روش ژنوتیپی PCR مورد بررسی قرار دادند و مقاومت به (کانامایسین ۹۷٪، توبرامایسین ۹۶٪، جنتامایسین ۸۷٪، آمیکاسین ۹۳٪ و نتیل مایسین ۸۰٪) را گزارش نمودند. در این مطالعه نتایج PCR نشان داد که ۸۳٪ سویه های MRSA دارای ژن $[aac(6')-Ie-aph(2'')]$ ۷۱٪ دارای ژن $aph(3')-IIIa$ و ۲۶٪ دارای ژن $ant(4')-Ia$ می باشند (۱۱۹).

۴- Freitas و همکاران در برزیل در سال ۱۹۹۹، ۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس ارئوس را از نظر مقاومت به متی سیلین و آمینوگلیکوزید با روش فنوتیپی آگاردایلوشن مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان

داد که همه ایزوله های MRSA (۱۰۰٪) و ایزوله از سویه های MSSA (۲٪) مقاوم به جنتامایسین و دیگر آمینوگلیکوزیدها با حداقل غلظت مهاری در دامنه (MIC > 64-256ug/ml) و ۵ ایزوله (۲۰٪) از میان ایزوله های MSSA حساس به جنتامایسین و مقاوم به کانامایسین (MIC > 32-256ug/ml) و نئومایسین با (MIC > 32-128) و ۲ ایزوله (۴٪) مقاوم به توبرامایسین با (MIC > 32 and 512ug/ml) می باشند. مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در این مطالعه در ۲۲ سویه (۴۴٪) تعیین شد و مقاومت به جنتامایسین نیز ۳۰٪ گزارش گردید (۱۲۰).

۵- Turutoglu و همکاران در ترکیه در سال 2009، ۱۸ ایزوله استافیلوکوکوس ارئوس را که از نمونه های ماستیت گاوی استخراج نموده بودند را از نظر مقاومت به متی سیلین و آمینوگلیکوزیدها با روش فنوتیپی دیسک دیفیوژن و PCR بررسی کردند. نتایج به دست آمده نشانگر حضور ۲۵٪ ژن *mecA*، ۱۷٪ ژن *aph-IIIa* و ۶٪ ژن *aac(6')/aph(2'')* و مقاومت ۵۰٪ به جنتامایسین به روش دیسک دیفیوژن می باشد (۱۲۱).

۶- Choi و همکاران سال ۲۰۰۳ در کره ۹۲ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس که ۴۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت و ۴۷ ایزوله CNS بودند را از نظر بیان ژن های عامل مقاومت به آمینوگلیکوزیدها با روش مولکولی Multiplex PCR مورد بررسی قرار دادند که از بین آنها ۶۵ درصد ایزوله ها دارای ژن *[aac(6')/aph(2'')]*، ۴۱ درصد دارای ژن *ant(4'')* و ۹ درصد دارای ژن *aph(3')* گزارش شدند (۱۲۲).

۷- Liakopoulos و همکاران سال ۲۰۱۱ در یونان ۱۲۲۸ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس را از نظر مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، با دو روش فنوتیپی دیسک دیفیوژن و روش ژنوتیپی PCR مورد بررسی قرار دادند که نتایج آن به این صورت گزارش شد، ۵۹۲ ایزوله (۴۸/۲٪) درصد دارای یکی ژن های

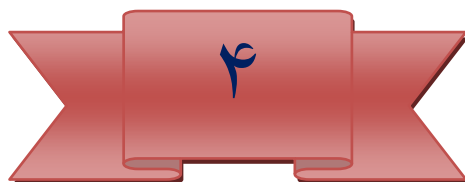
عامل مقاومت بودند که از این بین ۴۳۴ ایزوله (۷۳/۳) درصد دارای ژن aph(3')-IIIa ، ۸۱ ایزوله (۱۳/۷) درصد دارای ژن ant(4'')-Ia و ۷۷ ایزوله (۱۳) درصد دارای ژن [aac(6')/-Ie- aph(2'')] گزارش شدند (۱۲۳).

۸- دکتر عینی و همکاران سال ۲۰۱۳ در ایران ۱۵۱ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس را از نظر بیان ژن های عامل مقاومت به آمینوگلیکوزید ها را با روش ژنوتیپی PCR مورد بررسی قرار دادند که نتایج این مطالعه به این صورت گزارش شده است، ژن [aac(6')-Ia-aph(2'')] در ۱۸ ایزوله ، ژن aph(3')-IIIa در ۸ ایزوله، حضور هم زمان هر سه ژن در ۶۹ ایزوله حضور هم زمان دو ژن [aac(6')-Ia-aph(2'')] و ant(4') در ۶ ایزوله و حضور همزمان دو ژن aph(3')-IIIa و ant(4') در ۸ ایزوله گزارش گردید (۱۲۴).

۹- هاوس چیلد و همکاران سال ۲۰۰۸ در لهستان ۱۱۸ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس را از نظر مقاومت به آمینوگلیکوزیدها به دو روش فنوتیپی دیسک دیفیوژن و ژنوتیپی PCR مورد بررسی قرار دادند که نتایج این مطالعه به این صورت گزارش شده است. ۳۸/۱ درصد کل ایزوله ها به یکی از آنتیبیوتیک های به کار رفته در این مطالعه مقاومت نشان دادند. به غیر از یک ایزوله از بین ایزوله های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها ۴۴ ایزوله (۹۷/۸) درصد مقاوم به کانامایسین بودند. مقاومت به نئومایسین و توبرامایسین به ترتیب در ۳۷ ایزوله (۸۲/۲) درصد و ۳۲ ایزوله (۷۱/۱) درصد گزارش شده است. و (۲۴/۴) درصد به جتتامایسین و آمیکاسین مقاومت نشان دادند. حضور ژن های عامل مقاومت به ترتیب زیر گزارش شده است، -[aac(6') le-aph(2'')] در ۱۳ ایزوله (۲۸/۹) درصد، ant(4')-Ia در ۱۲ ایزوله (۲۶/۷) درصد و aph(3')-IIIa در ۲ ایزوله (۴/۴) درصد گزارش شده است (۱۲۵).

۱۰- آردیک و همکاران سال ۲۰۰۶ در ترکیه ۱۰۳ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس را از نظر مقاومت به متی سیلین به دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی بررسی کردند، ۵۰ ایزوله که شامل ۱۷ ایزوله استافیلوکوکوس

اورئوس و ۳۳ ایزوله CNS بودند که از نظر مقاومت به متی سیلین مثبت شدند، بعد این ۵۰ ایزوله را از نظر مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و فراوانی بیان ژن های عامل مقاومت به روش مولکولی MultiplexPCR مورد بررسی قرار دادند که نتایج آنها به روش زیر گزارش شده است. ژن [aac(6')-Ie-aph(2'')] در ۶۶ درصد ایزوله ها، ژن ant(4')-Ia در ۲۴ درصد و ژن aph(3')-IIIa در ۸ درصد ایزوله ها مثبت گزارش گردید (۱۲۶).



بخش چهارم

مواد و روش ها

۱- جامعه مورد مطالعه

جامعه ی مورد مطالعه ، کلیه سویه های استافیلوکوکوس اورئوس که از نمونه های بالینی بیماران بستری دریافت شده و به آزمایشگاه های بیمارستان های آموزشی قزوین و پاره ای از بیمارستانهای تهران ارسال شده است ، می باشد . بر اساس پارامترهای آماری مطالعه تعیین حجم نمونه تعداد نمونه ها ۲۳۰ نمونه می باشد که از هر بیمارستان بصورت تصادفی انتخاب می شود. این عدد با توجه به شیوع ضریب اطمینان ۹۵ درصد و دقت ۶ درصد بدست آمد.

$$n = \frac{Z_{1-\frac{\alpha}{2}}^2 \times P \times (1 - P)}{d^2} = 230$$

$$p = 0/25, d = 0/06, 1 - \alpha = 0/95$$

نوع مطالعه : اپیدمیولوژیک مولکولی- توصیفی

جدول ۷-متغیرها:

عنوان متغیر	مستقل	وابسته	کمی		کیفی		تعریف علمی	مقیاس
			پیوسته	گسسته	اسمی	رتبه ای		
نوع نمونه کلینیکی					×		براساس نوع نمونه ایی که سویه استافیلوکوک لورئوس از آن جدا می شود	
نوع بیمارستان					×		۴ بیمارستان آموزشی قزوین و ۲ بیمارستان تهران	
مقاومت به آنتی بیوتیک					×		براساس نتایج دیسک دیفیوژن و اندازه منطقه عدم رشد و مطابقت با جداول CLSI	حساس/ > د واسط / مقاوم
حداقل غلظت مهاربجتماعامپسین					×		براساس نتایج E test و تعیین حداقل مقدار آنتی بیوتیک بر حسب میلی لیتر / میکروگرم که درشرایط آزمایشگاهی از رشدباکتری ممانعت کرده و مطابقت آن با جداول CLSI	حساس/ > د واسط / مقاوم
حضور ژن مقاوم به آمینوگلیکوزیدها و ant(4')-Ia , aph(3')-IIIa, aac-(6')-Ie- /aph(2'')					×		براساس نتایج PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر ژن	دارد/ ندارد

۲- جمع آوری نمونه

در این مطالعه کلیه ی نمونه های ارسالی از بیماران بستری در بیمارستان های آموزشی شهرهای قزوین و تهران به آزمایشگاههای بیمارستان که استافیلوکوکوس اورئوس تشخیص داده شد ، مورد بررسی قرار گرفت .

نمونه ها از آزمایشگاه های تشخیصی بیمارستان های آموزشی قزوین شامل کوثر (زنان)، شهید رجایی (سوانح و جراحی)، بوعلی (داخلی) و قدس (کودکان) و بیمارستان امام حسین تهران (داخلی ۶۰۰ تختخوابی) به مدت ۱۱ ماه جمع آوری شدند. هم چنین اطلاعات دموگرافیک و بالینی بیماران از پرونده ی پزشکی آنان جمع آوری گردید.

لازم به ذکر است که نمونه های بیماران سرپایی و تکراری از جامعه مورد مطالعه حذف گردیدند.

کلیه نمونه ها ابتدا به منظور حصول اطمینان از خالص بودن، در محیط نوترینت آگار تجدید کشت و ایزوله شدند. پس از آن به منظور تعیین هویت قطعی و تشخیص، از آزمایشات زیر استفاده گردید.

۳- آزمایش های تشخیص فنوتیپی و تعیین هویت:

۱- رنگ آمیزی گرم برای مشاهده مورفولوژی باکتری ها

۲- آزمایش کاتالاز

۳- آزمایش DNase

۴- کواگولاز لام و لوله ای

۵- رشد بر روی مانیتول سالت آگار

۶- انجام آزمایش PCR جهت ژن *femA* جهت تایید گونه های استافیلوکوکوس اورئوس

کلیه سویه های گرم مثبت، کاتالاز مثبت، کوآگولاز مثبت، *DNase* مثبت که بر روی مانیتول سالت آگار رشد می کردند و دارای ژن *femA* بودند به عنوان گونه استافیلوکوکوس اورئوس در نظر گرفته می شدند.

مواد و وسایل موردنیاز:

۱. کیت رنگ آمیزی گرم

۲. آب اکسیژنه ۳٪

۴. سرم فیزیولوژی

۵. پلاسمای خرگوش

۶. محیط کشت مانیتول سالت آگار

۷. محیط کشت *DNAase*

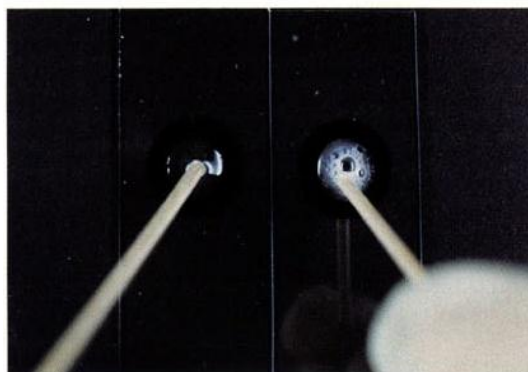
۸. اسیدکلریدریک

۹. لام و لوپ

روش کار:

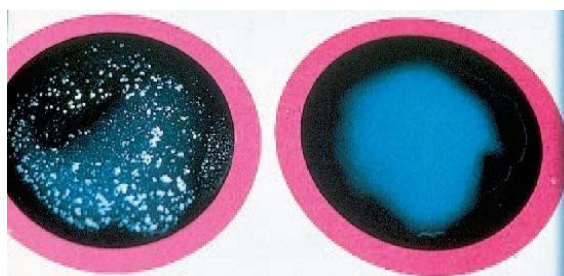
رنگ آمیزی گرم: با کمک رنگ آمیزی گرم تمامی کوکسی های گرم مثبت جداسازی شدند.

آزمایش کاتالاز : جهت انجام این آزمایش، ابتدا H_2O_2 ۳۰٪ را به میزان ۰/۱ رقیق می کنیم. مقدار کمی از کلنی باکتری کشت داده شده در محیط نوترینت آگار را به وسیله هم زن چوبی برداشته و روی لام قرار داده سپس یک قطره از H_2O_2 ۳٪ را روی آن چکانده، ایجاد حباب نشان دهنده وجود آنزیم کاتالاز در باکتری است.



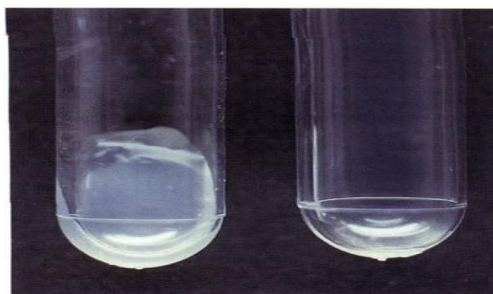
تصویر ۱۰- تست کاتالاز روی لام

آزمایش کوآگولاز روش لام: بر روی کلیه نمونه ها ابتدا تست کوآگولاز به روش اسلایدی انجام شد. بدین صورت که یک کلونی از باکتری را در یک قطره سرم فیزیولوژی کاملاً "حل کرده سپس یک قطره پلاسمای خرگوش دارای EDTA (شرکت سیگما ، آلمان) به آن اضافه کرده و با حرکت دورانی لام آن را مخلوط کرده و تشکیل لخته و مثبت شدن تست بررسی گردید.



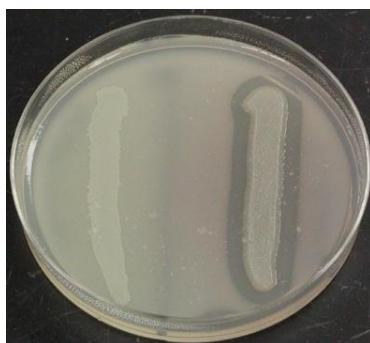
کوآگولاز لوله ای : ایزوله هایی که در روش اسلایدی منفی شدند با روش لوله ایی نیز تست گردیدند. در این روش مستقیماً "یک لوپ پر از باکتری را به ۰/۵ سی سی پلاسمای رقیق شده

اضافه و به مدت ۴ ساعت در 35°C قرار می گرفت. پس از زمان انکوباسیون در صورت عدم مشاهده لخته و منفی بودن، یک شبانه روز در درجه حرارت اتاق انکوبه شده. زیرا برخی سویه ها اگر به مدت طولانی در 35°C درجه قرار گیرند آنزیم فیبرینولیزین تولید می کنند، که سبب حل شدن لخته در زمان انکوباسیون می شود و در صورت عدم وجود لخته، منفی تلقی می گردید. از سویه های کنترل مثبت و منفی جهت کنترل پلاسما استفاده می شد.



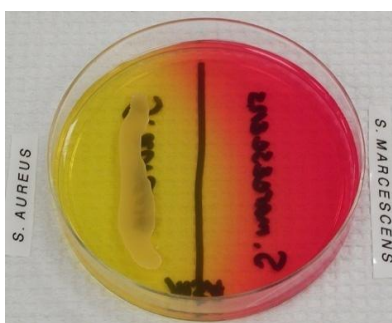
تصویر ۱۱- تست کوآگولاز لوله ای

آزمایش DNase : کشت تلقیحی کلونی باکتری به صورت نقطه ایی در محیط DNAase آگار (QUELAB، انگلستان) انجام شد و محیط به مدت یک شبانه روز در 37°C درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از گذشت این دوره با مشاهده رشد باکتری، چند قطره اسیدکلریدریک یک نرمال را بر سطح محیط ریخته و بعد از چند دقیقه اگر اطراف منطقه کشت هاله شفاف مشاهده گردد، تست مثبت تلقی می گشت. در این آزمایش از کنترل مثبت و منفی استفاده شده است.



تصویر ۱۲- تست DNase

آزمایش مانیتول سالت آگار: از محیط نوترینت آگار یک کلونی برداشته و در لوله های حاوی محیط مانیتول سالت آگار (QUELAB، انگلستان) به صورت عمقی کشت می دهیم. پس از یک شبانه روز انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد، اگر باکتری قادر می بود از قند مانیتول استفاده کند، با تولید اسید رنگ محیط از صورتی به زرد تبدیل می شود.



تصویر ۱۳- تست مانیتول سالت آگار روی پلیت

- آماده سازی محیط ها، بافرها و محلول های استفاده شده :

- محیط آگار خون دار :

با استفاده از محیط Blood Agar Base، طبق دستور کارخانه سازنده، پس از حل کردن پودر محیط با حجم تعیین شده آب و جوشاندن آن، محیط جهت استریل شدن، اتوکلاو شد و پس از رسیدن دمای محیط کشت به 50°C ، ۵٪ خون کامل انسان در مجاورت شعله به آن اضافه شد، همچنین هنگام ریختن خون ارلن حاوی محیط کشت به آرامی تکان داده شد تا کاملاً خون با محیط هموژن شود، سپس در پلیت های استریل توزیع گردید. برای کنترل آلودگی، پلیت ها به مدت یک شبانه روز در 37°C ، انکوبه شدند. پس از آن برای نگهداری به یخچال انتقال داده شدند. از این محیط برای ایزولاسیون اولیه باکتری ها استفاده شد.

- محیط مانیتول سالت آگار :

طبق دستور کارخانه سازنده، پودر محیط در حجم معینی از آب مقطر حل شد، سپس جوشانده و پس از اتوکلاو و رسیدن دمای محیط کشت به 50°C ، در پلیت های استریل، توزیع شد و بعد از قرار دادن در انکوباتور 37°C ، جهت کنترل آلودگی، در دمای 4°C ، نگهداری شد. از این محیط برای تفريق اولیه استافیلوکوکوس اورئوس از سایر گونه ها استفاده شد.

- محیط اوره :

محیط اوره نسبت به اتوکلاو شدن حساس میباشد، بنابراین ابتدا آب مقطر، لوله های آزمایش مورد نیاز جهت توزیع محیط، محیط پایه اوره حل شده در آب مقطر طبق دستور کارخانه سازنده و یک بشر کوچک اتوکلاو شدند. پس از رسیدن دمای آب مقطر به 80°C ، پودر اوره در شرایط استریل در آن حل

شده و به محیط پایه اضافه گردید. سپس در لوله های آزمایش آماده شده تقسیم شده و در دمای 4°C نگهداری شد.

- محیط DNase :

طبق دستور کارخانه سازنده، پودر محیط در حجم معینی از آب مقطر حل شد، سپس جوشانده و پس از اتوکلاو و رسیدن دمای محیط کشت به 50°C ، در پلیت های استریل، توزیع شد و بعد از قرار دادن در انکوباتور 37°C ، جهت کنترل آلودگی، در دمای 4°C ، نگهداری شد. از این محیط برای تفریق اولیه استافیلوکوکوس اورئوس از سایر گونه ها استفاده شد.

ذخیره سازی جدایه های بدست آمده:

با استفاده از تست های فوق 230 ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس تعیین هویت شده و برای انجام آزمایشات بعدی یک لوپ پر از جدایه کشت 24 ساعته باکتری به ویال های حاوی محیط تریپتی کیس سوی براث (TSB) (Merck ، آلمان) استریل و 10 درصد گلیسرول اضافه گردید و پس از $24-18$ ساعت گرماگذاری در 35°C به فریزر 20°C - منتقل شد. از محیط TSB استریل حاوی 30 درصد گلیسرول و خون جهت ذخیره باکتری در فریزر 80°C - استفاده شد.

۱-۳- تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی :

جدول ۸- دیسک آگار دیفیوژن (DAD)

دیسک های آنتی بیوتیکی آمینو گلیکوزیدی

دیسک های سایر آنتی بیوتیک ها

Gentamycin
Amikacin
Kanamycin
Tobramycin
Netilmicin

Teicoplanin
Mupirocin
Doxycyclin
Rifampicin
Ciprofloxacin

۲-۳- تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC)

آنتی بیوگرام:

برای انجام آنتی بیوگرام ابتدا از باکتری ها غلظتی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد.

*استاندارد ۰/۵ مک فارلند :

در ابتدا استوک های اسید سولفوریک ۱٪، کلرید باریم ۱/۱۷۵٪ تهیه شد، سپس برای تهیه ۰/۵ مک فارلند) غلظت ۱/۵×۱۰^۸/ml)، ۰.۰۵ ml از کلرید باریم ۱٪ با ۹.۹۵ ml اسید سولفوریک ۱/۱۷۵٪ مخلوط شد. در ضمن استاندارد مورد نظر، در تاریکی و دمای اتاق، به مدت ۶ ماه پایداری دارد. از آن به عنوان استاندارد سوسپانسیون سلولی جهت آنتی بیوگرام استفاده شد. جهت تهیه نیم مک فارلند از اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۲۰ نانومتر استفاده شد است. OD نیم مک فارلند در این طول موج معادل ۰/۱-۰/۰۸ است.

- دیسک آگار دیفیوژن (DAD) :

ابتدا محیط MHA طبق دستور العمل CLSI تهیه شد. برای این منظور محیط در پلیت های ۱۲ سانتی متری به عمق ۴ میلیمتر پخش شده و پس از منعقد شدن، برای کنترل آلودگی ۲۴ ساعت در ۳۵ °C گرماگذاری شد. از کشت ۱۸-۲۴ ساعته باکتری های رشد یافته در محیط نوترینت آگار سوسپانسیونی با کدورتی معادل غلظت ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. سپس از این سوسپانسیون باسواب استریل روی محیط مولر هینتون آگار در سه جهت مختلف تلقیح کرده و پس از چند دقیقه دیسک های آنتی بیوتیک با فاصله ۲۲ میلیمتر از یکدیگر و ۱۶ میلیمتر از جداره پلیت روی محیط قرار داده شدند. پس از آن در دمای ۳۵ °C گرماگذاری شده و سپس قطر هاله عدم رشد برای کلیه آنتی بیوتیک ها پس از ۲۰-۱۶ (ونکومایسین پس از ۲۴ ساعت) با خط کش قرائت شد.

از سویه استاندارد *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 جهت کنترل آزمایشات تعیین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک ها استفاده شد.

۴- روش های تشخیص مولکولی

۴-۱- استخراج DNA

مواد و وسایل موردنیاز

۱. محیط LB

۲. ایزوپروپانول

۳. لیزواستافین

۴. پودر تریس
۵. پودر EDTA
۶. کیت استخراج
۷. سمپلر و سر سمپلر
۸. میکروتیوب ۱/۵
۹. شیکر (shaker)
۱۰. میکروسانتریفیوژ
۱۱. انکوباتور شیکردار
۱۲. انکوباتور ۳۷ درجه
۱۳. ترموبلوک یا بن ماری ۶۰ درجه
۱۴. نانودراپ

روش کار

ابتدا تمامی ایزوله ها در ۰.۵ ml محیط (LB) Luria broth به مدت یک شبانه روز در ۳۷ درجه سانتی گراد در شیکر انکوباتور کشت داده شدند . سپس تمامی نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ شده و به رسوب به دست آمده ۱۸۵ میکرولیتر بافر TE (1X) که ترکیبی از پودر تریس و EDTA (Merck ، آلمان) است (ضمیمه ۱) و ۱۵ میکرولیتر لیزواستافین نو ترکیب (۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر، شرکت

سیگما آلمان) اضافه شد. در ادامه به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. پس از آن DNA ژنومی تمامی نمونه ها با استفاده از کیت استخراج DNA genomic DNA kit extraction (Bioneer Inc., South Korea) طبق دستور العمل آناستخراج گردید. جهت تأیید غلظت DNA استخراجی، تمامی نمونه ها توسط سیستم نانودراپ ۱ (آمریکا) در نسبت A260 به A280 اندازه گیری شدند.

۲-۴-PCR

مواد و وسایل موردنیاز

۱. ترموسایکلر
۲. میکروسانتریفیوژ
۳. میکروتیوب ۱/۵ و ۰/۵
۴. سمپلر و سر سمپلر
۵. شیکر
۶. پرایمر
۷. آب دیونیزه استریل
۸. Mgcl2

۹. PCR buffer

۱۰. dNTP

۱۱. Taq polymerase

۱۲. DNA template

روش کار

۳-۴- تعیین هویت مولکولی

برای تعیین هویت مولکولی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس از ژن **femA** که در تمامی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس حضور دارد، استفاده شد. بنابراین تمامی ایزوله ها از نظر حضور ژن **femA** با استفاده از آزمون PCR بررسی شدند .

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش PCR شامل ۲۰۰ میکرومول dNTP (ژن فن آوران)، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر (ژن فن آوران)، ۱/۵ میلی مول در لیتر **MgCL2** (ژن فن آوران)، ۰/۵ واحد آنزیم **Taq** (ژن فن آوران) و ۵۰ نانوگرم **DNA** الگو می باشد. تکثیر ژن مذکور تحت شرایط جدول ۲-۴ با استفاده از دستگاه ترمال سیکلر (Applied biosystem,USA) (شکل ۲-۴) انجام شد. تمامی واکنش ها در ۳۵ سیکل انجام گردید.

پرایمرهای ژن **femA** در جدول ۳-۴ آورده شده است.



تصویر ۱۴- دستگاه ترموسایکلر Applied biosystems (ساخت کشور آمریکا) استفاده شده در مطالعه حاضر

۴-۴-PCR ژن های مقاومت به آمینوگلیکوزید ها :

واکنش زنجیره ایی پلیمراز بر روی تمامی ۲۳۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس بر روی ژن های $aph(3')-IIIa$ و $ant(4')-Ia$ [aac(6')-Ie-/aph-(2'')] انجام گرفت.

پرایمرهای ژن های $aph(3')-IIIa$ ، $ant(4')-Ia$ و [aac(6')-Ie-/aph-(2'')] در جدول ۳-۴ آورده شده است.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش PCR شامل ۲۰۰ میکرومول dNTP (ژن فن آوران)، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر (ژن فن آوران)، ۱/۵ میلی مول در لیتر $MgCl_2$ (ژن فن آوران)، ۰/۵ واحد آنزیم Taq (ژن فن آوران) و ۵۰ نانوگرم DNA الگو می باشد. تکثیر ژن مذکور تحت شرایط جدول ۲-۴ با استفاده از دستگاه ترمال سیکلر (Applied biosystem, USA) انجام شد. تمامی واکنش ها در ۳۵ سیکل انجام گردید. تمامی واکنش ها در ۳۵ سیکل انجام گردید.

۵-۴- الکتروفورز

مواد و وسائل مورد نیاز

۱۳. پودر آگارز (Agarose)
۱۴. بافر 1X TBE (Tris-HCl Boric Acid EDTA)
۱۵. Loading Buffer (Fermentase)
۱۶. Marker (Ladder) (Fermentase)
۱۷. سینی ژل (Gel Tray)
۱۸. شانه ژل (Gel Comb)
۱۹. تانک الکتروفورز (Electrophoresis Tank)
۲۰. منبع تغذیه الکتریکی (Power supply)
۲۱. سمپلر و سرسمپلر (Tip)

روش کار

تهیه بافر 1X TBE:

برای تهیه بافر 20X TBE ۱۰۸ گرم از Tris و ۵۵ گرم از بوریک اسید در ۹۰۰ میلی لیتر آب حل کرده و سپس 40ml EDTA (pH=8 , 0.5mM) به آن اضافه شد و بعد حجم به یک لیتر رسانده شد. سپس بافر 1X TBE از بافر 10X تهیه و از آن در تانک الکتروفورز و تهیه ژل استفاده گردید.

تهیه ژل الکتروفورز:

برای الکتروفورز محصولات PCR از ژل 1 درصد آگارز استفاده شد. بدین صورت که مقدار مورد نیاز از آگارز در مقدار مورد نیاز از بافر TBE حل و بمدت ۱ دقیقه حرارت داده شد تا محلول کاملاً "شفافی به دست آمد. به ژل ذوب شده به میزان ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر سایبرگرین اضافه گردید و سپس داخل سینی الکتروفورز که داخل آن شانه تنظیم گردیده، ریخته شد تا ژل به صورت جامد درآمد. با احتیاط شانه از ژل خارج گردید و ژل برای الکتروفورز داخل تانک الکتروفورز قرار داده شد.

روش انجام الکتروفورز

بافر 1XTBE را به مقدار مورد نیاز در داخل تانک الکتروفورز ریخته و سینی حاوی ژل ۱ درصد را در درون تانک قرار داده شد. به کمک سمپلر مقدار ۳-۴ میکرولیتر از مارکر با احتیاط و به آرامی در داخل یکی از چاهک های ژل ریخته شد. سپس مقداری از محلول Loading Buffer (6X) را نسبت به اندازه چاهک بوسیله سمپلر با نسبت ۱ به ۶ با محصول PCR مخلوط کرده و به آرامی و با احتیاط در داخل چاهک ژل ریخته شد. درب تانک بسته و به منبع تغذیه الکتریکی وصل گردید. منبع تغذیه الکتریکی ولتاژ مناسب تنظیم شد. میزان ولتاژ نسبت به اندازه باند تنظیم شد. پس از پایان زمان الکتروفورز (بسته به ولتاژ و اندازه ژل ۴۰ دقیقه تا ۱ ساعت)، منبع تغذیه الکتریکی خاموش شد و با رعایت ایمنی ژل را از تانک خارج گردید و در دستگاه Gel-Documentation (شکل ۳-۴) قرار داده و تحت نور UV عکس گرفته شد.

جدول ۹- شرایط دمایی PCR ژن های *femA*، *aph(3')-IIIa*، *ant(4')-Ia*، [*aac(6')-Ie-/aph-(2'')*]

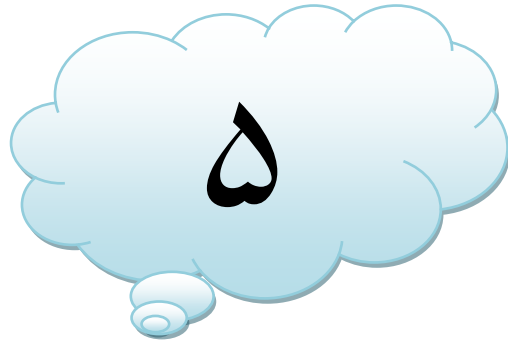
Gene	initial denaturation	Denaturation	annealing	extension	final extension
<i>femA</i>	94°C for 5 min	94°C for 2 min	58°C for 2 min	72°C for 2 min	72°C for 7 min
<i>aph(3')-IIIa</i>	94°C for 5 min	94°C for 2 min	55°C for 2 min	72°C for 2 min	72°C for 7 min
<i>ant(4')-Ia</i>	94°C for 5 min	94°C for 2 min	55°C for 2 min	72°C for 2 min	72°C for 7 min
[<i>aac(6')-Ie-/aph-(2'')</i>]	94°C for 5 min	94°C for 2 min	55°C for 2 min	72°C for 2 min	72°C for 7 min

جدول ۱۰- توالی پرایمرهای ژنهای *femA*، [*aac(6')-Ie-/aph-(2'')*]، *ant(4')-Ia*، *aph(3')-IIIa*

Gene	Primers (5'-3')	Size of amplified product (bp)	Reference
<i>aph(3')-IIIa</i>	F- GGCTAAAATGAGAATATCACCGG R- CTTTAAAAAATCATACAGCTCGCG	523	۷۹
<i>ant(4')-Ia</i>	F- CAAACTGCTAAATCGGTAGAAGCCR- GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT	294	۷۹
<i>aac(6')-Ie-/aph-(2'')</i>	F- CAGGAATTTATCGAAAATGGTAGAAAAG R- CACAATCGACTAAAGAGTACCAATC	369	۷۹
<i>femA</i>	F-AAAAAAGCACATAACAAGCG R-GATAAAGAAGAAACCAGCAG	132	۷۹

۵- روش جمع آوری و تجزیه و تحلیل داده ها

پس از جمع آوری داده ها یافته ها در قالب جداول فراوانی نمودار و شاخص های عددی ارائه گردید. داده ها به وسیله ی نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ تجزیه و تحلیل شد.



بخش پنجم

یافته ها

۱- یافته های زمینه ایی

در مجموع ۲۳۰ ایزوله از بیمارستان های آموزشی قزوین (بوعلی ، شهید رجایی ، قدس و کوثر) و امام حسین (ع) تهران در مدت ۱۱ ماه جمع آوری گردید. ایزوله ها به ترتیب بیشتر از بیمارستان امام حسین (ع) (داخلی ۶۰۰ تخت خوابی) ۱۶۵ ایزوله (۷۱/۷٪) ، قدس (کودکان) ۲۲ ایزوله (۱۱٪) ، شهید رجایی (جراحی و سوانح) ۲۱ ایزوله (۱۰/۵٪) ، بوعلی ۱۵ (داخلی) ایزوله (۷/۵٪) و کوثر (زنان) ۷ ایزوله (۳/۵٪) جمع آوری شدند.

بیماران

از ۲۳۰ بیمار بستری در بیمارستان های مذکور، به ترتیب از جنس مرد ، ۱۲۹ مورد (۵۶٪) ، جنس زن ۸۱ مورد (۳۵/۲ درصد) و نوزادان ۲۰ مورد (۸/۶٪) ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جدا شد. میانگین سنی بیماران بستری مورد مطالعه ۴۴/۸ سال محاسبه گردید.

نمونه ها

ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه های مختلف جمع آوری شدند که از آن میان بیشترین درصد را نمونه های خون (۲۳/۹ درصد) و خلط (۲۳/۵ درصد) و کمترین درصد را نمونه های بافت (۱ درصد) و چشم (۰/۵ درصد) به خود اختصاص دادند. توزیع ایزوله های جمع آوری شده از نمونه های مختلف به شرح جدول ۱-۱۰ بودند.

جدول ۱۱- توزیع ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس برحسب نوع نمونه

نوع نمونه	تعداد	درصد
خون	۵۵	۲۳/۹
خلط	۵۴	۲۳/۵
زخم	۲۹	۱۲/۶
کاتتر	۲۲	۹/۶
ادرار	۲۰	۸/۷
آبسه	۱۸	۷/۸
ترشحات تنفسی	۹	۳/۹
بینی	۲	۰/۹
مفصل	۱۰	۴/۳
حلق	۲	۰/۹
جوش	۴	۱/۷
بافت	۲	۰/۹
چشم	۳	۱/۳
جمع کل	۲۳۰	۱۰۰

بخش های بیمارستانی

ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس از بخش های مختلف بیمارستانی جمع آوری شدند. توزیع ایزوله های جمع آوری شده از بخش های مختلف بیمارستانی به شرح جدول ۱-۲ بودند. همانطور که مشخص است ایزوله ها بیشتر از بخش های داخلی (۴۸ درصد) و مراقبت های ویژه (۳۰/۵ درصد) جداسازی شدند.

جدول ۱۲- توزیع ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس برحسب بخش بیمارستانی

بخش	تعداد	درصد
داخلی	۱۱۰	۴۷/۶
مراقبت های ویژه	۷۱	۳۰/۶
نوزادان	۱۹	۷
جراحی	۱۰	۴/۳
نورولوژی	۴	۱/۷
ارتوپدی	۴	۱/۷
CCU	۳	۱/۵
گوارش	۲	۱/۳
سوختگی	۲	۱/۳
عفونی	۲	۱/۳
چشم	۲	۱/۳
رادیوتراپی	۱	۰/۴
جمع کل	۲۳۰	۱۰۰

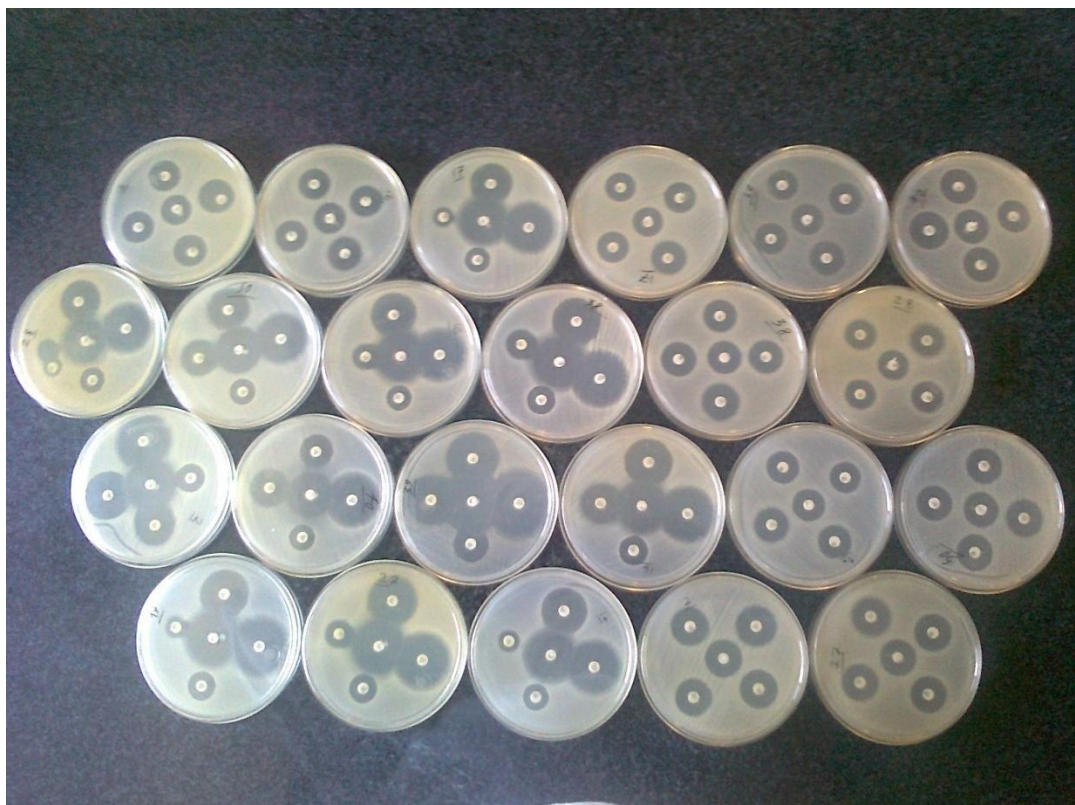
۲- یافته های آزمون فنوتیپی:

مقاومت به آنتی بیوتیک ها

ارزیابی فنوتیپی مقاومت به آنتی بیوتیک ها به روش دیسک دیفیوژن آگار AgarDisk Diffusion

جدول ۱۳- نتایج میزان حساسیت به آنتی بیوتیکهای مختلف در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس

آنتی بیوتیک	حساس (%)	حد واسط (%)	مقاوم (%)
کانامایسین	۹۰ (۳۹/۱)	۲۹ (۱۲/۶)	۱۱۱ (۴۸/۳)
توبرامایسین	۱۱۳ (۴۹/۱)	۹ (۳/۹)	۱۰۸ (۴۷)
جنتامایسین	۱۱۹ (۵۱/۷)	۳ (۱/۳)	۱۰۸ (۴۷)
آمیکاسین	۱۰۹ (۴۷/۴)	۱۵ (۶/۵)	۱۰۶ (۴۶/۱)
نیتیل مایسین	۱۴۴ (۶۲/۶)	۲۶ (۱۱/۳)	۶۰ (۲۶/۱)
داکسی سایکلین	۹۹ (۴۳)	۱۵ (۶/۵)	۱۱۶ (۵۰/۵)
سیپروفلوکساسین	۱۰۰ (۴۳/۵)	۱۵ (۶/۵)	۱۱۵ (۵۰)
ریفامپیسین	۱۴۲ (۶۱/۷)	۳ (۱/۳)	۸۴ (۳۶/۵)
موپی روسین	۲۰۰ (۸۶/۹۵)	۹ (۳/۹)	۲۱ (۹/۱)
تیکوپلانتین	۱۸۱ (۷۸/۷)	۳۹ (۱۷)	۱۰ (۴/۳)



تصویر ۱۵- تست آنتی بیوگرام روی پلیت

۲- تعیین حداقل غلظت مهاري (MIC) جنتامایسین به روش آگار دایلوشن طبق دستورالعمل CLSI

جدول ۱۴- حداقل غلظت مهاري (MIC) جنتامایسین به روش آگار دایلوشن

حداقل غلظت مهاری (MIC) جنتامایسین (µg/ml)		
مقاوم	حدواسط	حساس
≥۱۶	۸	≤۴
(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
۱۰۰ (۴۷/۴۳٪)	۰	۱۳۰ (۵۲/۵۶٪)

جدول ۱۴-حداقل غلظت مهاری (MIC) جنتامایسین به روش آگار دایلوژن

در این مطالعه MIC₅₀ غلظت 1 µg/ml و MIC₉₀ غلظت بالای ۲۵۶ µg/ml می باشد
تصویر ۱۶- تعیین MIC به روش آگار دایلوژن

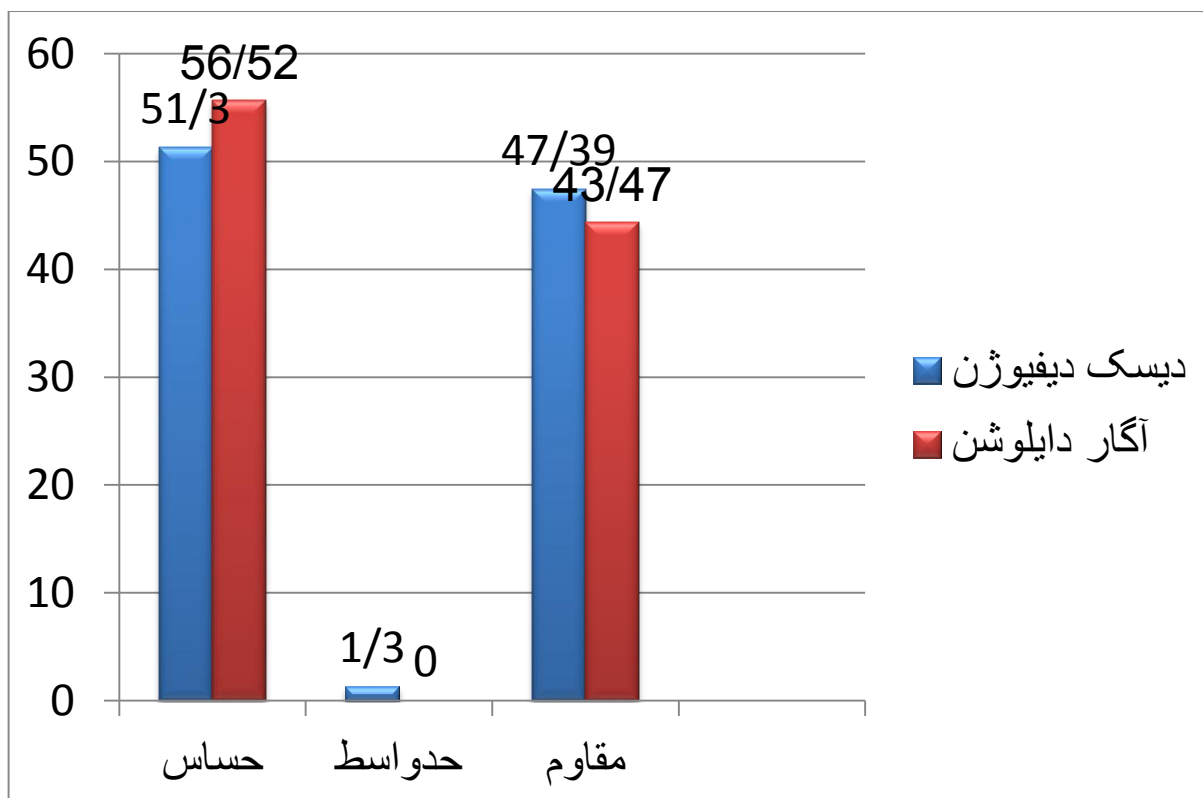


غلظت مهاری	تعداد
>۵۰	۱۰۰
۵۰	۵
۱	۱۰
۲	۱۵
۴	۰
۸	۰
۱۶	۱
۳۲	۱
۶۴	۰
۱۲۸	۲
۲۵۶	۳۸
>۲۵۶	۵۸

تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) جنتامایسین به روش آگار دایلوژن طبق
دستورالعمل CLSI

حداقل غلظت مهاری (MIC) جنتامایسین (µg/ml)		
مقاوم	حدواسط	حساس
≥۱۶	۸	≤۴
(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
۱۰۰ (۴۳/۴۷٪)	۰	۱۳۰ (۵۶/۵۲٪)

مقایسه نتایج دیسک دیفیوژن و آگار دایلوژن



۳-یافته های آزمون های مولکولی

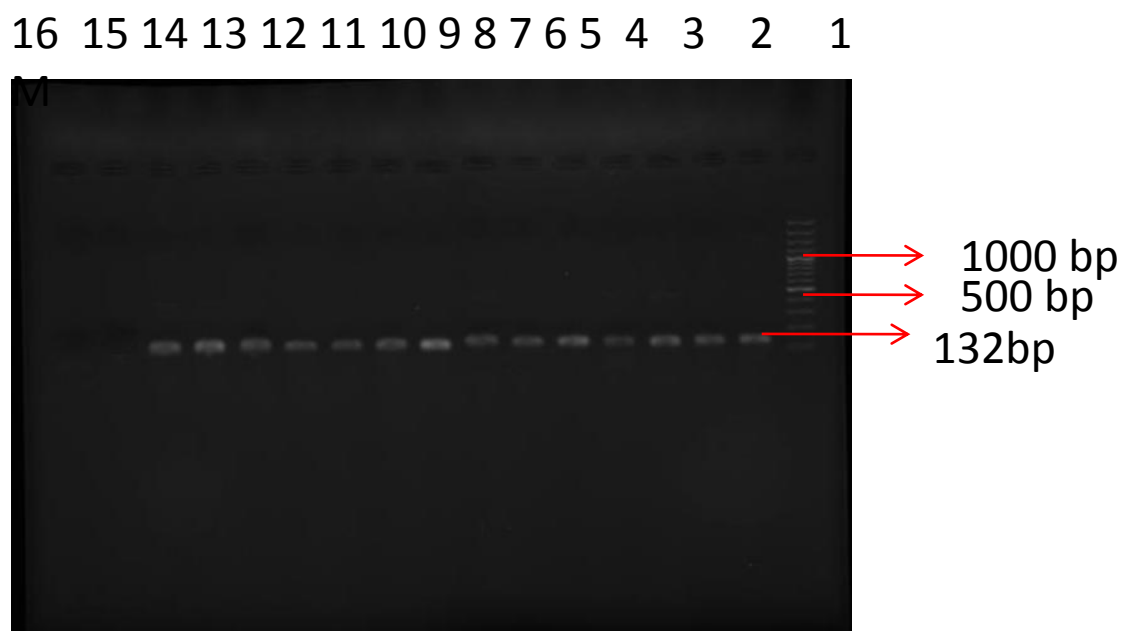
ژن femA

برای تمامی ایزوله‌هایی که در روش های فنوتیپی به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس تعیین هویت شدند،

PCR ژن femA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت. تنها ۲ ایزوله از نظر ژن femA

منفی شدند که از مطالعه خارج شدند. دویست و سی ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس در این روش مثبت

گردیده و با این روش مولکولی مورد تایید قرار گرفتند (شکل ۱-۵).



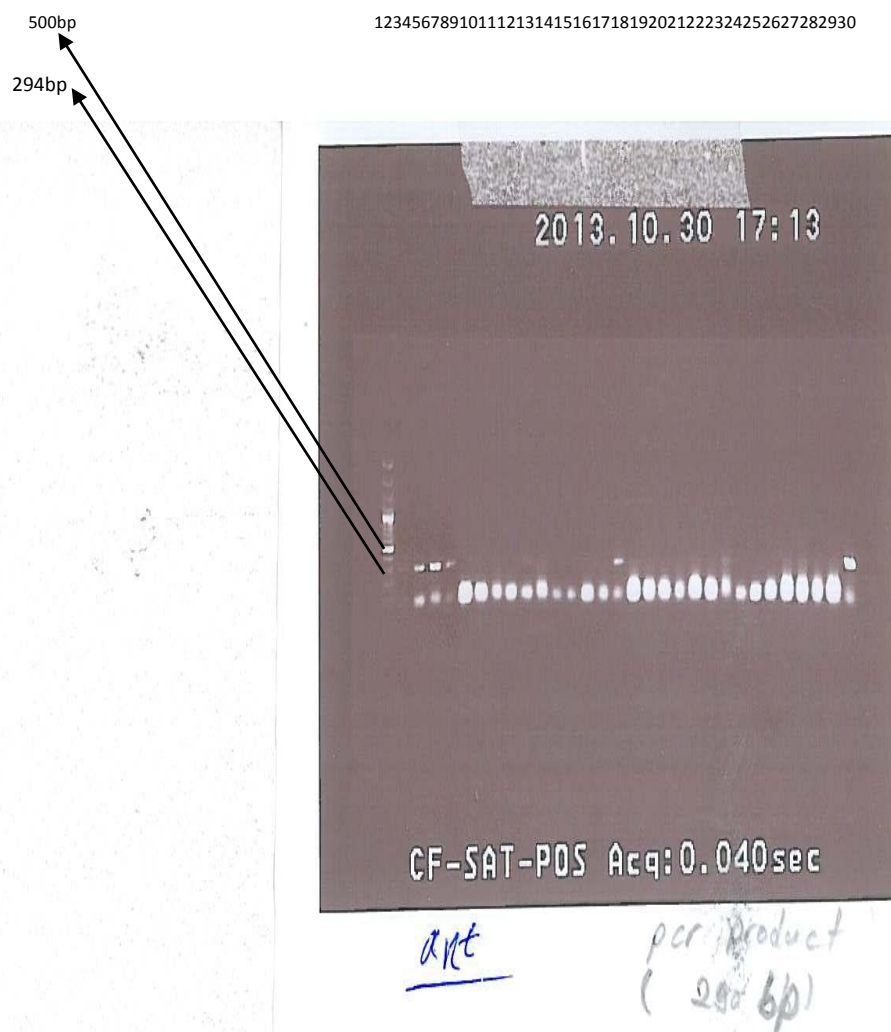
تصویر ۱۷- ژل الکتروفورز ژن femA. ردیف M مارکر 100bp. ردیف ۱ کنترل مثبت (ATCC 25923)

، ردیف ۲ تا ۱۴ ایزوله های بالینی مثبت ، ردیف ۱۵ ایزوله بالینی منفی و ردیف ۱۶ کنترل منفی آزمون

(no DNA) PCR

تصویر ۱۸- ژل الکتروفورز ژن "ant(4')Ia"

ردیف ۱ مارکر ردیف ۲ تا ۵ و ۱۵ ایزوله های بالینی مثبت ردیف ۳۰ کنترل مثبت



تصویر ۱۹- ژل الکتروفورز ژن aph(3')IIIa

ردیف ۱ و ۳۷ مارکر ردیف ۸ تا ۳ و ردیف های ۱۸، ۱۷، ۱۵، ۱۴، ۱۲ و ۲۰ تا ۳۲ ایزوله های بالینی مثبت و ردیف ۳۷ کنترل مثبت

523bp

500bp

۱۳۳۴۵۶۷۸۹۱۰۱۱۱۲۱۳۱۴۱۵۱۶۱۷۱۸۱۹۲۰۲۱۲۲۲۳۲۴۲۵۲۶۲۷۲۸۲۹۳۰

۳۱۳۲۳۳۳۴۳۵۳۶۵۳۷



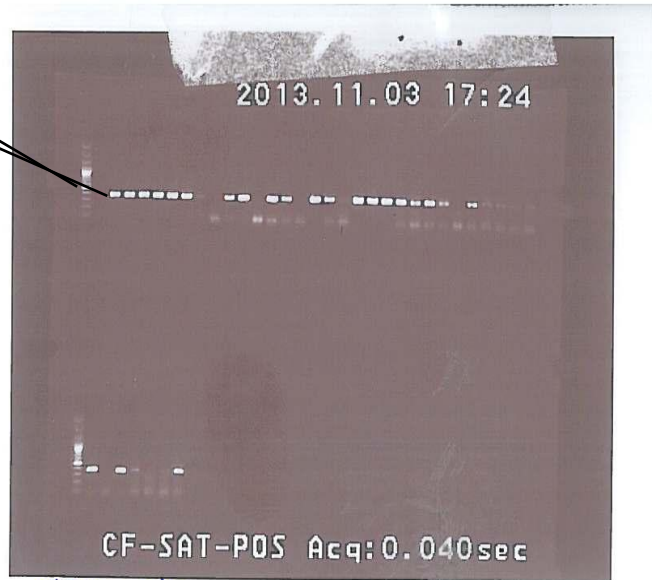
aph

تصویر ۲۰- ژل الکتروفورز ژن [aac(6')-Ie/aph(2'')]

۱۲۳۴۵۶۷۸۹۱۰۱۱۱۲۱۳۱۴۱۵۱۶۱۷۱۸۱۹۲۰۲۱۲۲۲۳۲۴۲۵۲۶۲۷۲۸۲۹۳۰۳۱۳۲

۳۳۳۴۵۶۷۸۹۱۰۱۱۱۲۱۳۱۴۱۵۱۶۱۷۱۸۱۹۲۰۲۱۲۲۲۳۲۴۲۵۲۶۲۷۲۸۲۹۳۰۳۱۳۲

369bp 500bp



ردیف های ۱ و ۳۳ مارکر ردیف های ۸ تا ۳ ایزوله بالینی مثبت ، ردیفهای ۱۵، ۱۴، ۱۲، ۱۱ و ۱۷ تا ۲۶ و ۲۸ تا ۳۲ و ۳۹، ۳۷، ۳۶، ۳۴ ایزوله های بالینی مثبت و ردیف ۴۰ کنترل مثبت می باشد.

جدول 15- فراوانی زن های مقاومت به آمینوگلیکوزید ها در ایزوله های استافیلوکوکوس

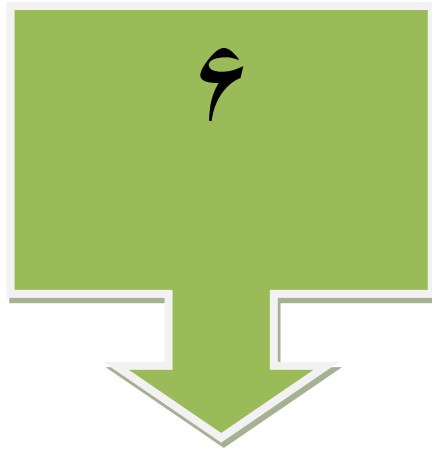
ژن	تعداد	درصد
ant(4')Ia"	۱۵	۶/۵
aph(3')IIIa	۴۲	۱۸/۳
aac(6')-Ie/aph[(]2")	۹۰	۳۹/۱
ant(4')Ia" + aph(3')IIIa	۰	۰
ant(4')Ia" aac(6')-Ie/aph +[(]2")	۴	۱/۷
] + aph(3')IIIa 2")(aac(6')-Ie/aph [۲۸	۱۲/۲
aac(6')-Ie/aph[(]+2") ant(4')Ia"+aph(3')IIIa	۱۱	۴/۷۸

جدول ۱۶- فراوانی زن های مقاومت به آمینوگلیکوزید ها در ایزوله های استافیلوکوکوس مقاوم از نظر فنوتیپی

ژن	تعداد	درصد
<i>ant(4')Ia"</i>	۱۵	۱۰/۳
<i>aph(3')IIIa</i>	۴۲	۲۹
<i>aac(6')-Ie/aph[(I2")</i>	۹۰	۶۲
<i>ant(4')Ia"</i> , <i>aph(3')IIIa</i>	۰	۰
<i>ant(4')Ia"aac(6')-Ie/aph[(I2")</i>	۴	۲/۷۵
<i>] aph(3')IIIa2")(aac(6')-Ie/aph[</i>	۲۸	۱۹/۳۱
<i>ant(4')I'aac(6')-Ie/aph[aph(3')IIIaa" (I2")</i>	۱۱	۷/۵۸

فراوانی ژن های عامل مقاومت در ایزوله های مقاوم به آنتی بیوتیک ها

درصد بیان ژنها در ایزوله های مقاوم به هر یک از آنتی بیوتیک ها به طور جدا گانه	Gen	Am	Ne	Ka	To	
<i>ant(4')Ia''</i>	93/3	80	60	93/3	93/3	%
<i>aph(3')IIIa</i>	97/6	97/6	81	97/6	97/6	%
<i>[aac(6')-Ie/aph (2'')]</i>	98/9	96/7	54/4	98/9	98/9	%



بخش ششم

بحث و نتیجه گیری

استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) به روشنی به عنوان یک عامل بیماری زای قدرتمند که عفونت های متعددی را ایجاد می کند شناخته شده است. استافیلوکوکوس اورئوس همچنین یکی از عوامل اصلی عفونت های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است که امروزه مقاومت چند گانه ای را نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها از جمله بتالاکتام ها (*Beta lactam*)، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین ها (*Tetracycline*)، فلوروکوئینولون ها (*Fluoroquinolones*) و ماکرولیدها (*Macrolides*) کسب کرده است. بنابراین امروزه تعداد محدودی از آنتی بیوتیک ها به عنوان داروهای ضد استافیلوکوکی همچون ونکومایسین (*Vancomycin*) و تیکوپلانیل (*Teicoplanine*) در دسترس هستند. مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوک ها به دلیل تولید بیش از حد *PBP2a* است که یک پروتئین متصل شونده به پنی سیلین تغییر یافته است و تمایل کمی برای اتصال به آنتی بیوتیک های خانواده بتالاکتام نشان می دهد (۴-۱).

آمینوگلیکوزیدها اغلب به صورت ترکیب با بتالاکتام ها و گلیکوپپتیدها در درمان اندوکاردیت باکتریایی که توسط انتروکوک ها (*Enterococcus*) و استافیلوکوک ها ایجاد می شود کاربرد دارند. این آنتی بیوتیک ها با اتصال به زیر واحد ریبوزومی 30S باعث تداخل در سنتز پروتئین های سلول باکتری می شوند (۵).

مقاومت به آمینوگلیکوزیدها هم در باکتری های گرم منفی و هم در گرم مثبت ها گزارش شده است. سه مکانیسم مقاومت شامل تغییر در جایگاه ریبوزومی اتصال دارو، کاهش در نفوذپذیری دارو و غیر فعال سازی آنزیمی دارو، مسئول مقاومت به آمینوگلیکوزیدها هستند. در این میان غیر فعال سازی آنزیمی آمینوگلیکوزیدها توسط آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها

(Aminoglycoside-modifying enzymes: AMEs) اصلی ترین مکانیسم مقاومت به این داروها در گونه های استافیلوکوکی است. این آنزیم ها به سه رده مختلف بر اساس فعالیت تغییردهندگی شان طبقه بندی می شوند که شامل آمینوگلیکوزید استیل ترانسفرازها AACs (Aminoglycoside-) acetyltransferases) آمینوگلیکوزید فسفریل ترانسفرازها APHs (Aminoglycoside-) phosphotransferases) و آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانس فرازها ANTs (Aminoglycoside-) nucleotidyltransferases) هستند (۹-۶).

در میان کوکسی های گرم مثبت چون استافیلوکوک ها، انتروکوک ها و استرپتوکوک ها (Streptococcus) پنج نوع از آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها وجود دارد. از این میان سه آنزیم aph(3')-I و AAC(6')/APH(2''), ANT(4')-I که به ترتیب توسط ژن های aph(3')-I و ant(4')-Ia و IIIa[aac(6')-Ie/aph(2'')] کد می شوند، از اهمیت ویژه ای برخوردارند زیرا آن ها جزء شایع ترین آنزیم های تغییر دهنده گونه های مختلف استافیلوکوک ها هستند و علاوه بر این سبب غیر فعال سازی آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی می شوند که از اهمیت درمانی و بالینی برخوردارند (۱۳-۱۰).

آمینوگلیکوزیدها با وجود داشتن سمیت کلیوی و سمیت شنوایی و مشکلاتی در ارتباط با افزایش مقاومت میکروارگانیسم ها نسبت به این داروها وجود دارد، همچنان در درمان عفونت های جدی استافیلوکوکی با ارزش هستند و نقش مهمی را در درمان و پیش گیری عفونت های ناشی از استافیلوکوک ها بازی می کنند. و به همین دلیل از آنها به عنوان عوامل ضد میکروبی مفید و با ارزش یاد می کنند. از میان این ویژگی ها می توان به فعالیت باکتریسیدالی وابسته به غلظت، اثر پس از مصرف آنتی بیوتیک Post-antibiotic effect: PAE) و آثار هم افزایی آنها با دیگر آنتی بیوتیک ها همچون بتالاکتام ها و گلیکوپپتیدها اشاره کرد (۲۳-۲۶). معمول ترین مکانیسم مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در استافیلوکوک ها تغییر و اصلاح آنها

توسط آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها است به صورتی که این آنتی بیوتیک ها دیگر قادر به اتصال به ریبوزوم نیستند. ژن های کد کننده این آنزیم ها یا روی پلاسمیدها (پلاسمیدهای مقاومت به جنتامایسین، نئومایسین، (Neomycin) و کانامایسین) یا روی کروموزوم قرار دارند (۲۷-۳۰). در خصوص آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی میزان مقاومت در آزمایش تعیین MIC به روش رقیق سازی در آگار به طور کلی کمتر از نتایج آزمایش انتشار از دیسک است. مقاومت به نئومایسین، آمیکاسین، جنتامایسین، توبرامایسین و کانامایسین در استافیلوکوک ها توسط آنزیم ANT(4')-I که به وسیله ژن ant(4')-Ia کد می شود واسطه گری می شود. این ژن اغلب روی پلاسمید های کوچک حمل می شود که این پلاسمیدها سپس به درون پلاسمیدهای کانژوگاتیوی (Conjugative) مانند pSK41 و در نهایت درون منطقه mec از کروموزوم سویه های استافیلوکوکوس اورئوس که احتمالاً "نتیجه حوادث نوترکیبی واسطه گری شده توسط IS257 (IS257-mediated recombination events) است، الحاق می شوند (۱۳). پلاسمید pUB110 که ژن ant(4')-Ia را حمل می کند درون SCCmec II الحاق شده است، همچنین پلاسمیدهای الحاقی حمل کننده ترانسپوزون (Transposone) Tn4001 که کد کننده ژن [aac(6')-Ie/aph(2'')] را حمل می کند درون SCCmec II الحاق شده است، همچنین پلاسمیدهای الحاقی حمل کننده ترانسپوزون (Transposone) Tn4001 که کد کننده ژن [aac(6')-Ie/aph(2'')] هستند در SCCmec IVc گزارش شده اند (۳۲).

در چنین مواردی احتمالاً "مقاومت به دلیل حضور ژن های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدی یا مکانیسم های دیگری همچون کاهش نفوذپذیری دارو یا تغییر اهداف ریبوزومی است.

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه در مجموع از ۲۳۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی ۹۲ ایزوله (۴۰ درصد) قابلیت تولید حداقل یکی از ژن های aph(3')-IIIa ، ant(4')-Ia و -aac(6')

[aac(6')-le/aph(2'')] AME کننده را داشتند که از آن میان ۹۰ ایزوله ۳۹/۱ درصد دارای ژن -aac(6') [le/aph(2'')] ۴۲ ایزوله ۱۸/۳ درصد دارای ژن aph(3')-IIIa و ۱۵ ایزوله ۶/۵ درصد دارای ژن ant(4')-Ia بودند.

نتایج مطالعات انجام شده در سایر کشورها نشان داده که ژن [aac(6')-le/aph(2'')] فراوان ترین ژن کد کننده آنزیم های AME در ایزوله های بالینی در کشورهای اروپایی است (۲۱-۱۲).

همچنین طی مطالعه ای که در سال ۲۰۰۳ توسط چوی و همکاران در کره انجام شد نتایج مشابهی به دست آمد به این صورت که ژن [aac(6')-le/aph(2'')] با فراوانی ۶۵ درصد شایع ترین ژن در میان ایزوله های مورد مطالعه بوده و بعد از آن ژن های ant(4')-Ia و aph(3')-IIIa به ترتیب با فراوانی ۴۱ درصد و ۹ درصد شناسایی شدند (۹۷).

در سال ۲۰۰۱ ایدا (Ida) و همکاران طی تحقیقی که در ژاپن انجام دادند نتایجی متفاوت با آنچه در کشورهای اروپایی به دست آمده بود، گرفتند. در این بررسی ژن ant(4')-Ia با فراوانی ۸۴/۵ درصد بیشترین شیوع را داشت و ژن های [aac(6')-le/aph(2'')] و aph(3')-IIIa هر کدام به ترتیب با فراوانی ۶۱/۷ درصد و ۸/۹ درصد در کل ایزوله ها شناسایی شدند (۹۲).

طی مطالعه ای که توسط فتح الله زاده و همکاران در سال ۲۰۰۹ در داخل کشور انجام شد، میزان مقاومت ۱۰۹ ایزوله MRSA نسبت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی به روش انتشار از دیسک بررسی شد. در این مطالعه ۹۷ درصد سویه ها مقاوم به کانامایسین، ۹۶ درصد مقاوم به توبرامایسین، ۸۷ درصد مقاوم به جنتامایسین، ۹۳ درصد مقاوم به آمیکاسین و ۸۰ درصد مقاوم به نتیل مایسین گزارش شدند. همچنین در این بررسی با استفاده از روش PCR فراوانی ژن های AME تعیین و به این صورت گزارش شد که ژن [aac(6')-le/aph(2'')] با فراوانی ۸۳ درصد دارای بیشترین شیوع و پس از آن ژن های aph(3')-IIIa و

ant(4')-la هر کدام به ترتیب با فراوانی ۷۱ و ۲۶ درصد در کل ایزوله ها شناسایی شدند (۹۴). یکی از

دلایل اصلی بالا بودن سطح مقاومت در این بررسی نسبت به مطالعه حاضر این است که این محققان

مقاومت آمینوگلیکوزیدی را تنها روی سویه های MRSA

بررسی و گزارش کرده اند؛ در حالی که در مطالعه حاضر مقاومت آنتی بیوتیکی در میان ۲۳۰ ایزوله

استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شده است.

شفیعی ثابت و همکاران در سال ۲۰۰۷ در مالزی مطالعاتی را بر روی ۱۵۲ ایزوله استافیلوکوک انجام دادند

و ۹۳ سویه (۶۱/۲٪) را با تعیین ژن FemA به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس گزارش کردند. نتایج مطالعه

نشان داد که ۴۸ سویه (۵۱/۶٪) دارای مقاومت به متی سیلین بوده و تمامی این سویه ها (۱۰۰٪) دارای

مقاومت به جنتامایسین و کانامایسین با روش های فنوتیپیک گزارش شده اند. در این مطالعه حداقل غلظت

مهارى برای جنتامایسین (MIC > 128-256 ug/ml) و برای کانامایسین (MIC > 64-256 ug/ml)

تعیین گردید و در تمامی این سویه ها (۱۰۰٪) وجود ژن [aac(6')-Ie-aph(2'')] [گزارش شد (۹۳).

همانطور که گفته شد از نظر بالا بودن شیوع ژن هم در این مطالعه و هم در مطالعه ای که ما انجام دادیم در

هر دو ژن [aac(6')-Ie-aph(2'')] (در الویت قرار دارد که از این نظر همخوانی دو مطالعه را نشان می

دهد، بالا بودن شیوع ژن [aac(6')-Ie-aph(2'')] (در این مطالعه نسبت به مطالعه حاضر به این دلیل است

که در این مطالعه ۱۵۲ ایزوله MRSA را از نظر بیان ژن های کد کننده AME بررسی کرده اند اما در

مطالعه حاضر ۲۳۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفته است.

- لیاکوپولس و همکاران سال ۲۰۱۱ در یونان ۱۲۲۸ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس را از نظر مقاومت به

آمینوگلیکوزیدها، با دو روش فنوتیپی دیسک دیفیوژن و روش ژنوتیپی PCR مورد بررسی قرار دادند که

نتایج آن به این صورت گزارش شد، ۵۹۲ ایزوله (۴۸/۲٪) درصد دارای یکی از ژن های عامل مقاومت بودند

که از این بین ۴۳۴ ایزوله (۷۳/۳) درصد دارای ژن aph(3')-IIIa ، ۸۱ ایزوله (۱۳/۷) درصد دارای ژن ant(4'')-Ia و ۷۷ ایزوله (۱۳) درصد دارای ژن [aac(6')/-Ie-aph(2'')] گزارش شدند (۹۸).

- دکتر عینی و همکاران سال ۲۰۱۳ در ایران ۱۵۱ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس را از نظر بیان ژن های عامل مقاومت به آمینوگلیکوزید ها را با روش ژنوتیپی PCR مورد بررسی قرار دادند که نتایج این مطالعه به این صورت گزارش شده است، ژن [aac(6')-Ia-/aph(2'')] در ۱۸ ایزوله ، ژن aph(3')-IIIa در ۸ ایزوله، حضور هم زمان هر سه ژن در ۱۶۹ ایزوله حضور هم زمان دو ژن [aac(6')-Ia-/aph(2'')] و ant(4') در ۶ ایزوله و حضور همزمان دو ژن aph(3')-IIIa و ant(4') در ۸ ایزوله گزارش گردید (۹۹).

- هاوس چیلد و همکاران سال ۲۰۰۸ در لهستان ۱۱۸ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس را از نظر مقاومت به آمینوگلیکوزیدها به دو روش فنوتیپی دیسک دیفیوژن و ژنوتیپی PCR مورد بررسی قرار دادند که نتایج این مطالعه به این صورت گزارش شده است. ۳۸/۱ درصد کل ایزوله ها به یکی از آنتیبیوتیک های به کار رفته در این مطالعه مقاومت نشان دادند. به غیر از یک ایزوله از بین ایزوله های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها ۴۴ ایزوله (۹۷/۸) درصد مقاوم به کانامایسین بودند. مقاومت به نئومایسین و توبرامایسین به ترتیب در ۳۷ ایزوله (۸۲/۲) درصد و ۳۲ ایزوله (۷۱/۱) درصد گزارش شده است. و (۲۴/۴) درصد به جتتامایسین و آمیکاسین مقاومت نشان دادند. حضور ژن های عامل مقاومت به ترتیب زیر گزارش شده است، -[aac(6') le-aph(2'')] در ۱۳ ایزوله (۲۸/۹) درصد، ant(4')-Ia در ۱۲ ایزوله (۲۶/۷) درصد و aph(3')-IIIa در ۲ ایزوله (۴/۴) درصد گزارش شده است (۱۰۰).

آردیک و همکاران سال ۲۰۰۶ در ترکیه ۱۰۳ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس را از نظر مقاومت به متی سیلین به دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی بررسی کردند، ۵۰ ایزوله که شامل ۱۷ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس و ۳۳ ایزوله CNS بودند که از نظر مقاومت به متی سیلین مثبت شدند، بعد این ۵۰ ایزوله را از نظر

مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و فراوانی بیان ژن های عامل مقاومت به روش مولکولی MultiplexPCR مورد بررسی قرار دادند که نتایج آنها به روش زیر گزارش شده است. ژن [aac(6')-Ie-aph(2'')] در ۶۶ درصد ایزوله ها، ژن ant(4')-Ia در ۲۴ درصد و ژن aph(3')-IIIa در ۸ درصد ایزوله ها مثبت گزارش گردید (۱۰۱).

Turutoglu و همکاران در ترکیه در سال ۲۰۰۹، ۱۸ ایزوله استافیلوکوکوس ارئوس را که از نمونه های ماستیت گاوی استخراج نموده بودند را از نظر مقاومت به متی سیلین و آمینوگلیکوزیدها با روش فنوتیپی دیسک دیفیوژن و PCR بررسی کردند نتایج به دست آمده نشانگر حضور ۲۵٪ ژن mecA، ۱۷٪ ژن aph-IIIa و ۶٪ ژن [aac(6')/aph(2'')] و مقاومت ۵۰٪ به جنتامایسین به روش دیسک دیفیوژن می باشد (۹۶).

Freitas - و همکاران در برزیل در سال ۱۹۹۹، ۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس ارئوس را از نظر مقاومت به متی سیلین و آمینوگلیکوزیدها با روش فنوتیپی آگاردایلوشن مورد بررسی قرار دادند نتایج این مطالعه نشان داد که همه ایزوله های MRSA (۱۰۰٪) و ۱۰ ایزوله از سویه های MSSA (۲٪) مقاوم به جنتامایسین و دیگر آمینوگلیکوزیدها با حداقل غلظت مهاری در دامنه (MIC > 64-256ug/ml) و ۵ ایزوله (۲۰٪) از میان ایزوله های MSSA حساس به جنتامایسین و مقاوم به کانامایسین (MIC > 32-256ug/ml) و نئومایسین با (MIC > 32-128) و ۲ ایزوله (۴٪) مقاوم به توبرامایسین با (MIC > 32 and 512ug/ml) می باشند. مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در این مطالعه در ۲۲ سویه (۴۴٪) تعیین شد و مقاومت به جنتامایسین نیز ۳۰٪ گزارش گردید (۹۵).

با توجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی به موازات مصرف بالینی بیش از اندازه و بی رویه این داروها، تشخیص سریع و به موقع سویه های مقاوم به منظور انتخاب گزینه

های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به نظر می رسد. شناسایی سریع و دقیق ژن های کد کننده آنزیم های AME با استفاده از روش PCR از مزیت های ویژه های برخوردار است، زیرا با استفاده از این روش که تکنیکی سریع و قابل اعتماد است، می توان ژن عامل مقاومت را در کمتر از ۳ ساعت شناسایی کرد.

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و مقایسه آن با سایر مطالعات مشابه مشاهده میشود که فراوانی و شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی با توجه به مناطق جغرافیایی متفاوت می باشد لذا شاید این دلیلی برای تفاوت بین نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات فوق باشد.

با توجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی به موازات مصرف بالینی بیش از اندازه و بی رویه این داروها تشخیص سریع و به موقع سویه های مقاوم به منظور انتخاب گزینه های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به نظر می رسد. شناسایی سریع ژن های کد کننده آنزیم های AME با استفاده از روش PCR از مزیت های ویژه ای مثل دقت و سرعت بالابرخوردار است.

تفاوت های موجود بین نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات دیگر دلیلی بر تفاوت در فراوانی و شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در بین کشورهای مختلف، بیمارستانهای متفاوت و بخش های بیمارستانی و حتی بین افراد یک جامعه می باشد.

می تواند مرتبط با * میزان مصرف آنتی بیوتیکی در این مناطق * بروز مکانیزم های مختلف مقاومت * انتخاب و انتشار کلون های مقاوم تحت فشار مصرف آنتی بیوتیکی باشد.

شاید این دلیلی دیگر برای انجام این گونه مطالعات باشد تا بتوان الگوی مقاومتی هر منطقه و بیمارستان را شناسایی و در راستای آن شیوه های کنترل عفونت و جلوگیری از انتشار مقاومت و مهمتر از همه کمک به

انتخاب شیوه های مناسب درمانی برای رهایی بیماران از عفونت های ناشی از این پاتوژن مهم و بسیار

مقاوم "استافیلوکوکوس اورئوس" گردد.

مطالعه حاضر	قزوین	۲۰۱۳	۲۳۰ ایزوله	آگار دایلوژن ، PCR	Aac/aph %۱/۳۹	Aph %۳/۱۸	ant %۵/۶
فتح ا... زاده و همکارانش	ایران	۲۰۰۵- ۲۰۰۶	۱۰۹ ایزوله MRSA	دیسک دیفیوژن PCR	%۸۳	%۷۱	%۲۶
دکتر عینی و همکاران	ایران	۲۰۱۳	۱۵۱ ایزوله	PCR	%۲۷/۵۸	%۹۶/۵۴	%۹۶/۵۴
چوی و همکارانش	کره	۲۰۰۳	۹۵ ایزوله	Multiplex PCR	%۶۵	%۹	%۴۱
Ida و همکارانش	ژاپن	۲۰۰۱	۳۸۱ ایزوله MRSA	آگار دایلوژن ، PCR	%۷/۶۱	%۹/۸	%۵/۸۴
لیاکوپولوس و همکارانش	یونان	۲۰۱۱	۱۲۲۸ ایزوله	دیسک دیفیوژن PCR	%۲۷/۶	%۳۴/۳۵	%۵۹/۶

نتیجه گیری و پیشنهادات

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و مقایسه آن با سایر مطالعات مشابه مشاهده میشود که فراوانی و شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی با توجه به مناطق جغرافیایی متفاوت می باشد لذا شاید این دلیلی برای تفاوت بین نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات فوق باشد.

با توجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی به موازات مصرف بالینی بیش از اندازه و بی رویه این داروها تشخیص سریع و به موقع سویه های مقاوم به منظور انتخاب گزینه های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به نظر می رسد. شناسایی سریع ژن های کد کننده آنزیم های AME با استفاده از روش PCR از مزیت های ویژه ای مثل دقت و سرعت بالا برخوردار است.

تفاوت های موجود بین نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات دیگر دلیلی بر تفاوت در فراوانی و شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در بین کشورهای مختلف ، بیمارستانهای متفاوت و بخش های بیمارستانی و حتی بین افراد یک جامعه می باشد. می تواند مرتبط با * میزان مصرف آنتی بیوتیکی در این مناطق * بروز مکانیزم های مختلف مقاومت * انتخاب و انتشار کلون های مقاوم تحت فشار مصرف آنتی بیوتیکی باشد. شاید این دلیلی دیگر برای انجام این گونه مطالعات باشد تا بتوان الگوی مقاومتی هر منطقه و بیمارستان را شناسایی و در راستای آن شیوه های کنترل عفونت و جلوگیری از انتشار مقاومت و مهمتر از همه کمک به انتخاب شیوه های مناسب درمانی برای رهایی بیماران از عفونت های ناشی از این پاتوژن مهم و بسیار مقاوم "استافیلوکوکوس اورئوس" گردد.

1. Novick PR, Schlievert P, Ruzin A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microb and Infect.* 2001;(3):585-594.
2. Lowy DF. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest.* 2003 ;111:1265-1273.
3. Mayhall, CG. *Hospital Epidemiology and Infection Control*. United States. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2004; 444-445.
4. Chang FY, Peacock JE Jr, Musher DM, Triplett P, MacDonald BB, Mylotte JM, O'Donnell A, Wagener MM, Yu VL. *Staphylococcus aureus* Bacteremia Recurrence and the Impact of Antibiotic Treatment in a Prospective Multicenter Study. *Medicine*; 2003; 333-339.
5. King MD, Humphrey BJ, Wang YF, et al. Emergence of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 Clone as the Predominant Cause of Skin and Soft-Tissue Infections. *Annals of Internal Medicine.* 2006 ;144:309-317
6. Siripornmongkolchai T, Chomvarin C, Chaicumpar K, Limpaiboon T, and Wongkhum C. Evaluation of different primers for detecting *mecA* gene by PCR in comparison with phenotypic methods for discrimination of methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *Southeast Asian Trop Med Public Health.* 2002 ;33(4):758-763.
7. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: Activity and Resistance. *Antimicrob Agent Chemother.* 1999 ;43:727-737.
8. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Feizabadi MM, Sedaghat H, Aligholi M, Taherikalani M, Jabalameli F. Characterisation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from two hospitals in Tehran, Iran. *Int J Antimicrob Agents.* 2009 ;33(3):264-265.
9. Busch-Sørensen C, Frimodt-Møller N, Miller GH, Espersen F. Aminoglycoside resistance among Danish blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci. *APMIS.* 1996 ;104(12):873-880.
10. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev.* 2003 ;16(3):430-450.
11. Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Aminoglycosides: Nephrotoxicity. *Antimicrob Agent Chemother.* 1999 ;43:1003-1012.
12. Wax RG, Lewis K, Salyers AA, Taber H. *Bacterial Resistance to Antimicrobials*, 2nd ed. CRC Press, USA, 2008 ; 71-101.

13. Ida T, Okamoto R, Shimauchi C, Okubo T, Kuga A, Inoue M. Identification of aminoglycoside-modifying enzymes by susceptibility testing: epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. *J Clin Microbiol*. 2001 ;39(9):3115-3121.
14. Porter VR, Green KD, Zolova OE, Houghton JL, Garneau-Tsodikova S. Dissecting the cosubstrate structure requirements of the *Staphylococcus aureus* aminoglycoside resistance enzyme ANT(4'). *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 ;403(1):85-90.
15. Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2001 ;14(4):836-871.
16. Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, Kang JH, Shin WS, Kang MW. Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species. *J Korean Med Sci*. 2003 ;18(5):631-636.
17. Topley & Wilson's. (2006). *Microbiology and Microbial Infections*. 10th ed. Vol2 Arnold pub, New York.
18. Ogston A. Micrococcus poisoning. *J Anal physiol*. 1883; 17:24-58.
19. Murray PR and Baron EJ. (2010). *Murray Medical Microbiology*. 7th ed.
20. Skinner D, Keefer CS. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. *Arch Intern Med*. 1941 ;68:851-875.
21. Fishetti VA, Novick R P, Ferretti J J, Portnoy D A, Rood J I, (2006). *Gram Positive Pathogens*. 2th ed.
22. Jevons, M.P, and Parker, M.T. The evolution of new hospital strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Pathol*. 1964;17:243-250.
23. Xue M X, Ito T, Tiensasitir C, Jamklang M, Chong Tracool P, Vavra S, et al. Novel type of *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* identified in community-acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(4): 1147-1152.
24. Witte W, Strommenger B, Cuny C, Heuck D, Nuebel U, Nuebel U. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* containing the panton valentine leukocidin in 2005 and 2006. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60:1258-1263.
25. DeLeo FR. Emergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest*. 2009 Sep;119(9):2464-2474.
26. Normanno G, La Salandra G, dambrosio A, Quaglia N, Corrente M, Parisi A, et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International journal of food microbiology*. 2007;115(3):190-196.
27. Kondo S, Yamada T, Misawa S, Nakamura A, Oguri T. [Morphological Gram staining]. *Kansenshogaku zasshi The journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*. 2008;82(6):656.

28. Mandell GL, Bennetts J, Dolin R. Principles and practice of infectious disease. 6th ed. 2006. Churchill living stone Inc. USA.
29. Simpson KH, Bowden G, Hook M, Anvari B. Measurement of adhesive forces between individual *Staphylococcus aureus* MSCRAMMs and protein-coated surfaces by use of optical tweezers. *Journal of bacteriology*. 2003;185(6):2031-2035.
30. Clarke SR, Foster SJ. Surface Adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Advances in microbial physiology*. 2006;51:187-224.
31. Verdrengh M, Thomas JA, Hultgren OH. IL-1 receptor-associated kinase 1 mediates protection against *Staphylococcus aureus* infection. *Microbes and infection*. 2004;6(14):1268-1272.
32. Sanderson AR, Sterominger JL, Nathenson SG. Chemical structure of teichoic acid from *Staphylococcus aureus*, strain Copenhagen. *Journal of Biological Chemistry*. 1962;237(12):3603-3613.
33. Verdier I, Durand G, Bes M, Taylor KL, Lina G, Vandenesch F, et al. Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR agglutination tests. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(3):725-729.
34. Jawetz E, et al. (2010). *Medical microbiology*. 25th ed.
35. Srinivasan A, Seifried S, Zhu L, Srivastava DK, Flynn PM, Shenep JL, et al. Panton-Valentine leukocidin- positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children with cancer. *Pediatric blood & cancer*. 2009;53(7):1216-1220.
36. Arciola CR, Baldassarri L, Von Eiff C, Campoccia D, Ravaioli S, Pirini V, et al. Prevalence of genes encoding for staphylococcal leukocidal toxins among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from implant orthopedic infections. *International journal of artificial organs*. 2007;30(9):792-797.
37. Amagai M, Yamaguchi T, Hanakawa Y, Nishifuji K, Stanley JR. Staphylococcal exfoliative toxin B specifically cleaves desmoglein 1. *Journal of investigative dermatology*. 2002;118(5):845-850.
38. Vasconcelos N, Da Cunha M. Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods. *Journal of Public Health and Epidemiology*. 2010;2(3):29-42.
39. Silversides JA, Lappin E, Ferguson AJ. Staphylococcal toxic shock syndrome: mechanisms and management. *Current infectious disease reports*. 2010;12(5):392-400.
40. Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, Shopsin B, et al. agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology*. 2008;154(8):2265-2274.
41. Coelho LR, Souza RR, Ferreira FA, Guimaraes MA, Ferreira- Carvalho BT, Figueiredo AMS. Agr RNAIII divergently regulates glucose-induced biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*. 2008;154(11):3480-3490.

42. Ulrich M, Bastian M, Cramton SE, Ziegler K, Pragman AA, Bragonzi A, et al. The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces *ica* gene transcription and polysaccharide intercellular adhesion expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. *Molecular microbiology*. 2007;65(5):1276-1277.
43. Cunha B.A. Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*: clinical manifestations and antimicrobial therapy. *Clin Microb Infect*. 2005;11(Suppl.4):33-42.
44. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13:16-34.
45. McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: An update. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:77-104.
46. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Tenover SA, Mietzner TA. *Medical Microbiology*. United States. 25th ed, The McGraw-Hill Companies, 2010;223-224.
47. Yarwood JM, McCormick JK, Schlievert PM. Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2001 ;183:1113-1123.
48. Shands KN, Schmid GP, Dan BB, et al. Toxic-shock syndrome in menstruating women: Association with tampon use and *Staphylococcus aureus* and clinical features in 52 cases. *N Engl J Med*. 2008;303:1436-1442.
49. Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, et al. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J Clin Microbiol*. 2003;41:1434-1439.
50. Fauci AS, Kasper DL, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL. *Harrison's principles of internal medicine*. 17th Edition. United States. The McGraw-Hill Companies, Inc, 2008:1145-61.
51. Reingold AL, Hargrett NT, Shands KN, et al. Toxic shock syndrome surveillance in the United States, 1980 to 1981. *Ann Intern Med*. 1982;96:875-880.
52. Kaul R, McGeer A, Norrby-Teglund A, et al. Intravenous immunoglobulin therapy for streptococcal toxic shock syndrome-A comparative observational study. The Canadian Streptococcal Study Group. *Clin Infect Dis*. 2000;28:800-807.
53. Weems JJ, Beck LB. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as a risk factor for skin and soft tissue infections. *Curr Infect Dis Rep*. 2002;4:420-425.
54. Gampfer J, Thon V, Guile H, et al. Double mutant and formaldehyde inactivated TSST-I as vaccine candidates for TSST-I-induced toxic shock syndrome. *Vaccine*. 2002;20: 1354-1364.
55. Altekruze SF, Cohen ML, Swerdlow DL. Emerging foodborne diseases. *Emerg Infect Dis*. 2000;3:285-293.

56. Weinstein MP, Towns ML, Quaney SM, et al. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: A prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis.* 2000;24:584-602.
57. Gouello JP, Asfar P, Brenet O, et al. Nosocomial endocarditis in the intensive care unit: An analysis of 22 cases. *Crit Care Med.* 2000;28:377-382.
58. Moreillon P, Que YA, Bayer AS. Pathogenesis of streptococcal and staphylococcal endocarditis. *Infect Dis Clin North Am.* 2002;16:297-318.
59. Osiyemi O, Dickinson G. Gram-positive pneumonia. *Curr Infect Dis Rep.* 2000;2:207-214.
60. Hoban OJ, Biedenbach DJ, Mutnick AH, et al. Pathogen of occurrence and susceptibility patterns associated with pneumonia in hospitalized patients in North America: Results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Study (2000). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;45:279-285.
61. EI-Solh AA, Sikka P, Ramadan F, et al. Etiology of severe pneumonia in the very elderly. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 ;163:645-651.
62. Sethi S. Bacterial pneumonia, Managing a deadly complication of influenza in older adults with comorbid disease. *Geriatrics.* 2002;57:56-61.
63. Bryant RE, Salmon CI. Pleural empyema. *Clin Infect Dis.* 2006;22:747-762.
64. Shirtliff ME, Mader JT. Acute septic arthritis. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:527-544.
65. Broy SB, Schmid FR. A comparison of medical drainage (needle aspiration) and surgical drainage (arthrotomy or arthroscopy) in the initial treatment of infected joints. *Clin Rheum Dis.* 2006;12:501-522.
66. Glen M C. Hospital Epidemiology and Infection Control. United states. 3rd Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2004:444-70.
67. Zhanel G G, DeCorby M, Laing N, Weshnoweski B. Antimicrobial-Resistant Pathogens in Intensive Care Units in Canada: Results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) Study, 2005-2006. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2008; 52(4):1430–1437.
68. Mayhall C.G. Methicillin-resistant staphylococcus aureus and vancomycin-resistant enterococci: colonization and infection in the critical care unit. Cunha B A. editors. *Infectious Diseases in Critical Care Medicine.* 3rd Edition. United states: Informa Healthcare ;2010 .p:102-127.
69. Del Giudice P, Bes M, Hubiche T, Roudiere L, Blanc V, Lina G, et al. Clinical manifestations and outcome of skin infections caused by the community-acquired

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST80-IV. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2011;25(2):164-169.

70. Farly JE. Epidemiology, clinical manifestations, and treatment options for skin and soft tissue infection caused by community-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of the American academy of Nurse Paractitions*. 2008;20(2):85-92.

71. Schneewind O and Missiakas D. *Staphylococcus aureus* and Related *Staphylococci*. Goldman E, Green LH. Editors. *Practical Handbook of Microbiology*. 2nd ed. United States: Taylor & Francis Group; 2009. p:303-305.

72. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Mprse SA, Mietzner TA. *Medical Microbiology*. United States. 25th ed, The McGraw-Hill Companies, 2010; 223-224.

73. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Mprse SA, Mietzner TA. *Medical Microbiology*. United States. 25th ed, The McGraw-Hill Companies, 2010; 223. -224.

74. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, et al. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: A meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2003;36:53-59.

75. Hancock R. E. W. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbial*. 1997;5:37-42.

76. Thomson, K.S. and Smith, M.E. The new beta-lactamases of gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes Infect*. 2000;2:1225-1235.

77. Hooper, D.C. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis*. 2000;31(suppl. 2):24-28.

78. Poole, K. Efflux mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:2233-2241.

79. Picot S, Rakotomalala R, Farny K, Simac C, Michault A. [Evolution of resistance to antibiotics from 1997 to 2005 in the Reunion Island]. *Med Mal Infect*. 2010 Nov;40(11):617-624.

80. Nimmo GR, Bell JM, Mitchell D, Gosbell IB, Pearman JW, Turnidge JD. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* in Australian teaching hospitals, 1989-1999. *Microbial Drug resistance*. 2003;9(2):155-160.

81. Peter M Hawkey, 1998 The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ*. 1998 September 5;317(7159):657-660.

82. Tenover FC, Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine*. 2006;119(6):3-10.

83. Beneveniste. R, Davies J, 1973, Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria. *Annual Review of Biochemistry*. 42;471-506.

84. Lalitha M. Manual on antimicrobial susceptibility testing. URL: <http://www.ijmm.org/documents/Antimicrobial.doc>. 2005.
85. Livermore. DM β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbial Rev.* 1995;8:557-584.
86. McManus MC. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J Health Syst Pharm.* 1997;54:1420-1433.
87. Michel M., Gutmann L. Methicillin-resistant staphylococcus aureus and vancomycin-resistant enterococci: therapeutic realities and possibilities. *Lancet.* 1997 Jun 28;349(9069):1901-1906.
88. Coutinho VLS, Paiva RM, Reiter KC, de-Paris F, Barth AL, Machado ABMP. Distribution of erm genes and low prevalence of inducible resistance to clindamycin among staphylococci isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2010;14(6):564-568.
89. Drlica K, Zhao X, DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997;61:377-392.
90. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter 1. Annual review of pharmacology and toxicology. 1999;39(1):361-398.
91. Lewis, K. Multidrug resistance pumps in bacteria: Variations on a theme. *Trends Biochem. Sci.* 1994;19:119-123.
92. Nikaido, H. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science.* 1994;264:382-388.
93. Nikaido H, Saier MH Jr. Transport proteins in bacteria: common themes in their design. *Science.* 1992 Nov 6;258(5084):936-942.
94. Paulsen IT, Lewis K. Microbial Multidrug efflux: introduction. *Journal of molecular Microbiology and Biotechnology.* 2001;3(2):143-144.
95. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology Reviews.* 2001;65(2):232-260.
96. Paulsen IT. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Current opinion in microbiology.* 2003;6(5):446-451.
97. Lubelski J, Konings WN & Driessen AJ. Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiology Mol Biol.* 2007;71:463-476.
98. Moriyama Y, Hiasa M, Matsumoto T & Omote H. Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)-type proteins as anchor transporters for the excretion of metabolic waste products and xenobiotics. *Xenobiotica.* 2008;38:1107-1118.

99. Nimmo GR, Bell JM, Mitchell D, Gosbell IB, Pearman JW, Turnidge JD. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* in Australian teaching hospitals, 1989-1999. *Microbial Drug Resistance*. 2003;9(2):155-160.
100. Hirschl A, Stanek G, Rotter M. Penicillin-resistance as inductor of resistance of *Staphylococcus aureus* towards cephalosporins and structure-related substances (author's transl). *Zentralbl Bakteriologie*. 1981;248(4):463.
101. Martins A, Lourdes M, Cunha R. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspect. *Microbial Immunol*. 2007;51(9):787-795.
102. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*. 2005;43(10):5026-5033.
103. Lim D, Strynadka NC. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP_{2a} from methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *Nat Struct Biol*. 2002 Nov;9(11):870-876.
104. Slade O, Jensen B, Bruce R, Lyon R. Genetics of Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology*. 2009;4(5):565-582.
105. Klein E, Smith DL, Laxminarayan R. Community-associated methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* in outpatients, United States, 1999-2006. *Emerging infectious diseases*. 2009;15(12):1925.
106. CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21st informational supplement. CLSI, Wayne, PA. M100-S21, 2011;31(1).
107. Acar JF, Goldstein FW. Trends in Bacterial resistance fluoroquinolones. *Clin Infect Dis*. 1997;24(1):67-73.
108. Marangon FB, Miller D, Muallem MS, Romano AC, Alfonso EC. Ciprofloxacin and levofloxacin resistance among methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* isolates from Keratitis and conjunctivitis. *American Journal of ophthalmology*. 2004;137(3):453-458.
109. Coskun-Ari F, Bosgelmez-Tinaz G. *grlA* and *gyrA* mutations and antimicrobial susceptibility in clinical isolates of ciprofloxacin-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Med Res*. 2008;13:366-3670.
110. Ito H, Yoshida H, Bogaki-Shonai M, Niga T, Hattori H, Nakamura S. Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase *gyrA* and *gyrB* genes of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994 Sep;38(9):2014-23.
111. Lak P, Amini M, Sfavi M, Shafiee A, Shahverdi AR. Enhancement of the antimicrobial activity of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* by 3-alkyl esters and 3-aryl esters of hexahydroquinoline derivatives. *Arzneimittel-Forschung*. 2008;58(9):464-468.
112. Bartkowiak J. Molecular methods in diagnosis of infectious diseases. *Przegląd epidemiologiczny*. 2003;57(2):381-390.

113. Baron EJ. Conventional versus Molecular Method for Pathogen Detection and the Role of Clinical Microbiology in Infection control . *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(9 Supplement):43.
114. Tang YW, Procop GW, Persing DH. Molecular diagnostics of Infectious diseases. *Clinical chemistry*. 1997;43(11):2021-2038.
115. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 1990;262(4):56-61.
116. Mullis KB, Faloona FA. Spesefic synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chine reaction. *Methods in enzymology*. 1987;155:335.
117. Ida T, Okamoto R, Shimauchi C, Okubo T, Kuga A, Inoue M. Identification of aminoglycoside-modifying enzymes by susceptibility testing: epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. *J Clin Microbiol*. 2001 ;39(9):3115-3121.
118. Sabet NS, Subramaniam G, Navaratnam P, Sekaran SD. Detection of methicillin- and aminoglycoside-resistant genes and simultaneous identification of *S. aureus* using triplex real-time PCR Taqman assay. *J Microbiol Methods*. 2007 ;68(1):157-162.
119. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Feizabadi MM, Sedaghat H, Aligholi M, Taherikalani M, Jabalameli F. Characterisation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from two hospitals in Tehran, Iran. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 ;33(3):264-265.
120. Freitas FI, Guedes-Stehling E, Siqueira-Júnior JP. Resistance to gentamicin and related aminoglycosides in *Staphylococcus aureus* isolated in Brazil. *Lett Appl Microbiol*. 1999 ;29(3):197-201.
121. Turutoglu H, Hasoksuz M, Ozturk D, Yildirim M, Sagnak S. Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their *mecA* genes. *Vet Res Commun*. 2009 Dec;33(8):945-956.
122. Choi SM, Kim SH, Kim SJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, Kany JH, Shin WS, Kang MW. Multiplex PCR for the Detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species. *J Korean Med* 2003;18(5):631-636.
123. Liakopoulos A, Foka A, Vourli S, Zerva L, Tsiapara F, Protonotariou E, Dailiana Z, Economou M, Papoutsidou E, Koutsia-Carouzou C, Anastassiou ED, Diza E, Zintzaras E, Spiliopoulou I, Petinaki E. Aminoglycoside-resistant staphylococci in Greece: prevalence and resistance mechanisms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 May;30(5):701-705.
124. Emaneini M, Bigverdi R, Kalantar D, Soroush S, Jabalameli F, Noorazar Khoshgnab B, Asadollahi P, Taherikalani M. Distribution of genes encoding tetracycline resistance and aminoglycoside modifying enzymes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a burn center. *Ann Burns Fire Disasters*. 2013 Jun 30;26(2):76-80.

125. Hauschild T, Sacha P, Wieczorek P, Zalewska M, Kaczyńska K, Tryniszewska E
Aminoglycosides resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from a University
Hospital in Białystok, Poland. *Folia Histochem Cytobiol.* 2008;46(2):225-228.
126. Ardic N, Sareyyupoglu B, Ozyurt M, Haznedaroglu T, Ilga U. Investigation of
aminoglycoside modifying enzyme genes in methicillin-resistant staphylococci. *Microbiol
Res.* 2006;161(1):49-54.

Abstract

Background and aim: *Staphylococcus aureus* one of the most common bacterial infection, these bacteria are an agent of nosocomial and community-acquired infections. Aminoglycosides are potent bactericidal agents that often used in combination with either a β -lactam or a glycopeptide, especially in the treatment of staphylococcal. Enzymatic inactivation of this antibiotic by cellular enzymes that modify aminoglycosides is the major mode of mechanisms for bacterial resistance to this drug. The aim of Present study was to determine the frequency of [aac(6')-Ie-aph(2'')] , ant(4')-Ia and aph(3')-IIIa genes encoding for enzymes of modify aminoglycosides by molecular method in clinical *S. aureus* isolates.

Materials and methods: In this study, within 14 months, 230 clinical *S. aureus* isolates were collected from patients in Qazvin and Tehran educational hospitals. All isolates were initially identified using standard biochemical and laboratory setting. Antibiotic susceptibility pattern determined by disk diffusion method according to the CLSI guideline by disc antibiotic gentamicin, Kanamycin, Tobramycin, Amikacin, Netilmicin, Ciprofloxacin, Doxycycline, Mupirocin, Rifampicin and Teicoplanin. Also the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the agar dilution method using Gentamicin antibiotic powder. For detection of resistance genes were used from three pairs of specific primers and their abundance were determined by using PCR.

Results: The highest rates of resistance to aminoglycosides were in Kanamycin (43/8 %), Gentamicin (47 %), Tobramycin (47%), Amikacin (46/1 %) and Netilmicin (26/1 %), respectively and non-high-level aminoglycoside-resistant antibiotics used in this study were Doxycycline (50/5 %), Ciprofloxacin (50 %), Rifampin (36/5 %), Mupirocin (9/1 %) and Teicoplanin (4/3 %), respectively. Forty four percent of strains were resistant to Gentamicin on agar dilution method. The frequency of [aac(6')-Ie-aph(2'')] , ant(4')-Ia and aph(3')-IIIa genes in the isolates was determined by PCR method that 39.1 %, 6.5 % and 18.3 % reported, respectively.

Conclusion: According to the results of this study and comparison with other similar studies, it is observed that the frequency and spread of antibiotic resistance varies according to geographical regions. So maybe this is the reason for the difference between the results of this study and other studies.

Considering the increasing prevalence of resistance to aminoglycoside antibiotics in parallel with the excessive and in discriminate clinical use of these drugs seemsearly detection and timely of resistant strains are essential, in order to select appropriate treatment options and prevent spread of resistance.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, [aac(6')-Ie-aph(2'')] , ant(4')-Ia , aph(3')-III, PCR

ضمیمہ

ضمیمه ۱

پلاسمای خرگوش

به پلاسمای لیوفلیزه (سیگما ، آلمان) ۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی اضافه کرده و پس از آن قابل استفاده است.

H₂O₂ 3%

برای ساخت ۲۰۰ میلی لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد، ۵ میلی لیتر آب اکسیژنه (۳۵ درصد) را به ۱۹۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه کرده و محلول را درفویل پوشانده و در تاریکی نگاه می داریم.

HCL 1N

برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر اسیدکلریدریک نرمال مقدار ۱۱/۹ میلی لیتر اسید (۳۶/۵-۳۸ درصد) را به ۸۸/۱ میلی لیتر آب مقطر اضافه می کنیم. این عمل در بالن ژوژه صورت می گیرد تا اسید به بیرون نپاشد. هم چنین باید توجه شود که اسید را به آهستگی به آب اضافه شود .

محیط مولر هیتون آگار دارای ۴ درصد نمک و پودراگزاسیلین

۴ گرم نمک را به ازای هر میلی گرم مولر هیتون در محیط کشت حل شده و سپس اتوکلاو می گردد . پس از اتوکلاو شدن و سرد شدن محیط تادمای تقریبی ۵۰ - ۴۵ درجه سانتیگراد ۶ میلی گرم پودر حل شده اگزاسیلین را توسط فیلتر به هر ۱۰۰۰ میلی لیتر محیط مولر هیتون اضافه می کنیم.

TE buffer 10X

۲/۴۲ گرم تریس (10 mM) را در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و سپس ۰/۷۴ گرم EDTA (1 mM) به آن اضافه کرده و به آرامی مخلوط می نماییم . با اسید کلریدریک یک نرمال (1N) pH برابر ۸ شده و در نهایت حجم کلی را به ۲۰ میلی لیتر رسانده شد.

TBE buffer 10X

۵۴ گرم تریس و ۲۷/۵ گرم اسیدبوریک را در ۶۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و سپس ۲۰ میلی لیتر EDTA (0.5 mM) به آن اضافه و به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

TBE buffer 1X

۵۰ میلی لیتر از بافر 10X را به ۴۵۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه می کنیم.

